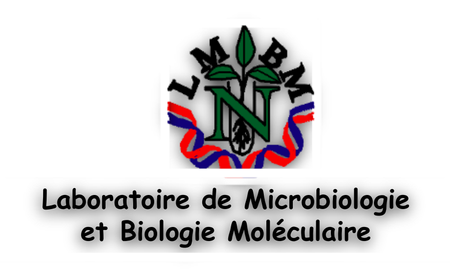
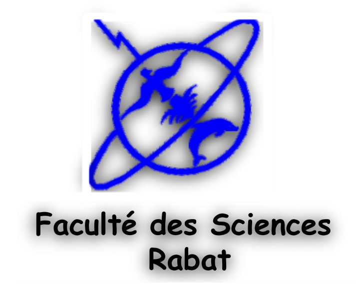






Filière SVI – S4
Module de Biochimie et Biologie Moléculaire
Elément 2: Biologie Moléculaire

REGULATION GENETIQUE CHEZ LES BACTERIES: OPERONS CATABOLIQUES & ANABOLIQUES

Année universitaire 2010-2011

Dr. Leila MEDRAOUI

OBJECTIFS

- Comprendre la régulation génétique chez les bactéries et son rôle.
- Savoir la notion de l'opéron.
- Connaître le principe du fonctionnement d'un opéron catabolique.
- Connaître le principe du fonctionnement d'un opéron anabolique.

PLAN

1. Introduction

1.1. Pourquoi il y a régulation de l'expression des gènes?

1.2. Qu'est-ce-que la REGULATION GENETIQUE ?

1.3. Niveaux de régulation

2. Régulation de la transcription

2.1. Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription

2.2. Contrôles positif-négatif

2.3. Notion d'opéron

3.Opéron catabolique: Opéron Lactose

3.1.Définition et structure

3.2.Fonctionnement

3.3.Mutation

4.Opéron anabolique: Opéron Tryptophane

4.1.Définition et structure

4.2.Fonctionnement

4.3.Mutation

1.Introduction

1.1.Pourquoi il y a régulation de l'expression des gènes?

Pour répondre aux conditions changeantes de l'environnement immédiat

La question posée dans ce chapitre est celle du choix des portions du génome devant être exprimées à un moment donné dans un environnement donné.

1.2. Qu'est-ce-que la REGULATION GENETIQUE ?

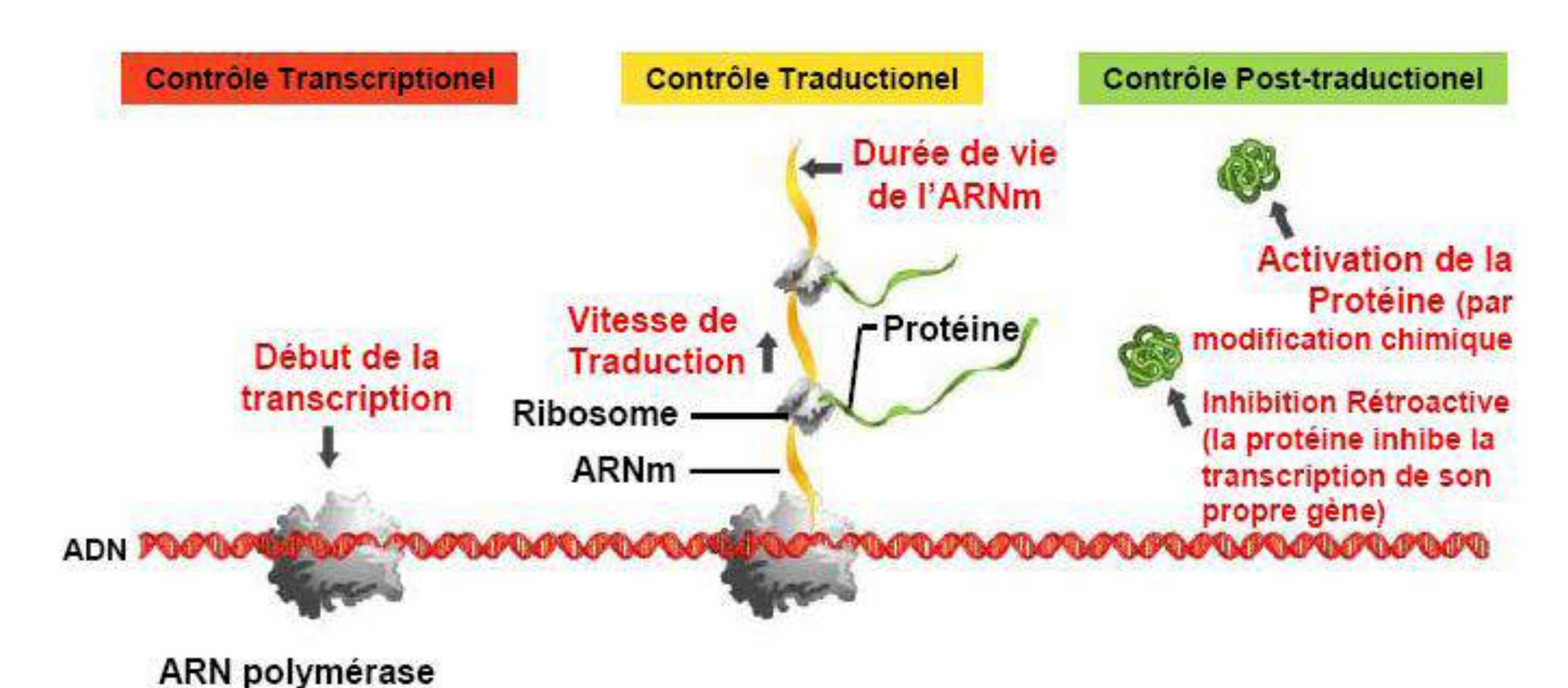
=Un moyen pour la cellule de développer des mécanismes qui lui permettent de réprimer les gènes qui codent pour des protéines inutiles et de les activer au moment où ils deviennent nécessaires

Deux modes de régulation de l'expression d'un gène cible par une molécule régulatrice :

1- d'une façon **positive** : **l'interaction *déclenche* la transcription du gène**

2- d'une façon **négative** : **l'interaction *empêche* la transcription du gène**

1.3.Niveaux de régulation



Quelques constats

1. Un organisme unicellulaire, avec un temps de génération très court, doit pouvoir répondre rapidement à des changements de son environnement.
2. Les demi-vies de la plupart des ARNm sont courtes (de l'ordre de quelques minutes).
3. La transcription et la traduction sont couplées et se réalisent dans le même compartiment cellulaire.

La régulation génique doit prendre effet tôt

effectivement

LE POINT DE CONTRÔLE MAJEUR = L'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION.

2.Régulation de la transcription

2.1.Stratégies de contrôle de l'initiation de la transcription

2 modes distincts de contrôle de l'initiation de la transcription

1- un **contrôle constitutif** qui dépend de la **structure du promoteur**

2- un **contrôle de régulation** qui est sous la dépendance de **protéines régulatrices**

CONTRÔLE CONSTITUTIF

- Niveau de base de l'initiation de la transcription déterminé par la structure du promoteur.
- Variabilité dans la séquence consensus du promoteur : modification de l'efficacité du promoteur.

Expression Constitutive

– Expression en tout temps de protéines nécessaires à la survie/croissance

– Généralement servant à:
  - synthèse de l'ADN et de l'ARN
  - Synthèse des Protéines
  - Enzymes du métabolisme
  - …

Les bactéries expriment seulement un sous-ensemble de leurs gènes à un temps donné

– L'expression de tous les gènes constitutivement dans les bactéries serait énergétiquement inefficace.
  - Ce n'est pas tous les promoteurs qui sont constamment accessible à l'ARN polymérase

– Les gènes qui sont exprimés sont essentiels pour traiter les conditions environnementales courantes, telles que le type de source disponible de nourriture.
  - Quels gènes sont transcrits dépend de quelles molécules spécifiques sont présentes dans le milieu (et dans la cellule)
  - L'expression des enzymes spécifiques exigées pour le métabolisme des molécules particulières peut être *induite ou réprimée sur demande*

CONTRÔLE de REGULATION

Principe de base de la régulation de la transcription :

La liaison d'une protéine spécifique à un site donné de l'ADN influence l'ensemble des évènements composant l'assemblage du complexe d'initiation et\ou l'initiation d'une synthèse productive d'ARN par l'ARN polymérase.

Régulation métabolique

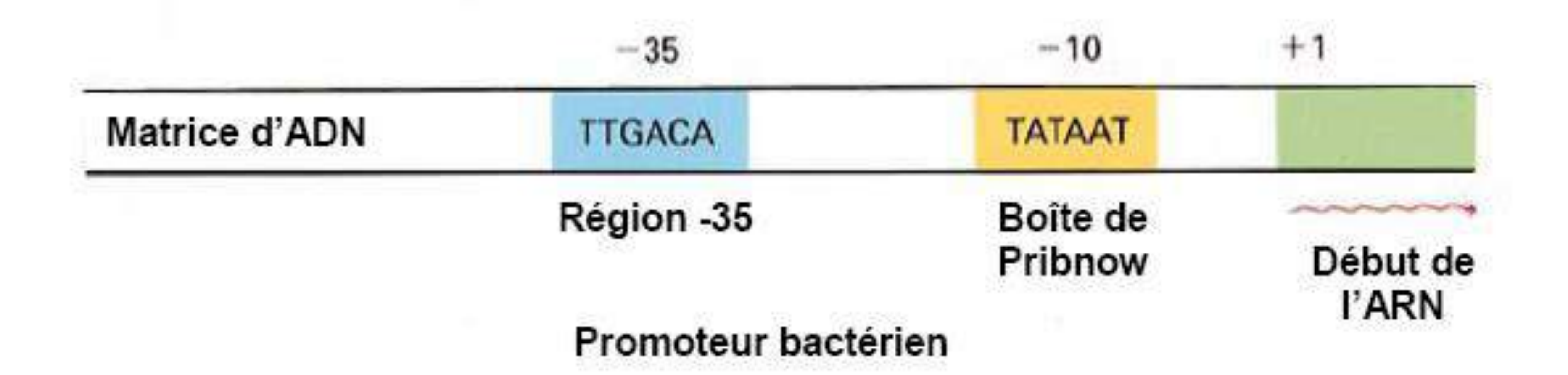
– De façon générale, plus il y a de la nourriture, plus les gènes sont transcrits.

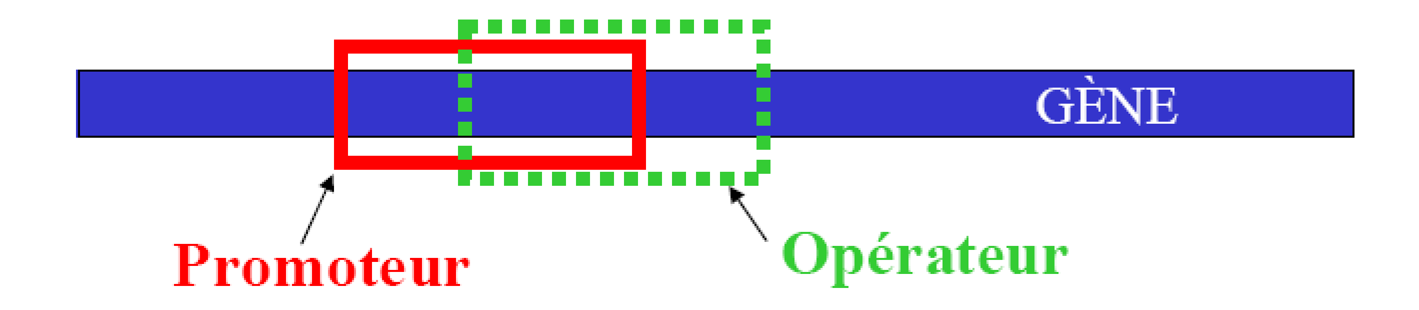
– Beaucoup de nourriture donne beaucoup d'ATP.

- Beaucoup d'enzymes utilisent l'ATP comme source d'énergie
- L'ATP est le nucléotide initiateur
- L'affinité pour un ATP initiateur est moins grande que pour un ATP d'élongation

Quelques définitions

- **Facteur de transcription**: **protéine de régulation transcriptionnelle.**
- **Activateur**: **protéine qui stimule l'initiation de la transcription favorise l'expression d'un gène.**
- **Répresseur** : **protéine qui inhibe la transcription et empêche l'expression d'un gène.**
- **Opérateur** : **site cible de la protéine répresseur** (souvent proche du site d'initiation de la transcription)


−35
−10
+1
Matrice d'ADN
TTGACA
TATAAT
Région -35
Boîte de
Pribnow
Début de
l'ARN
Promoteur bactérien


GÈNE
Promoteur
Opérateur

Quelques définitions…

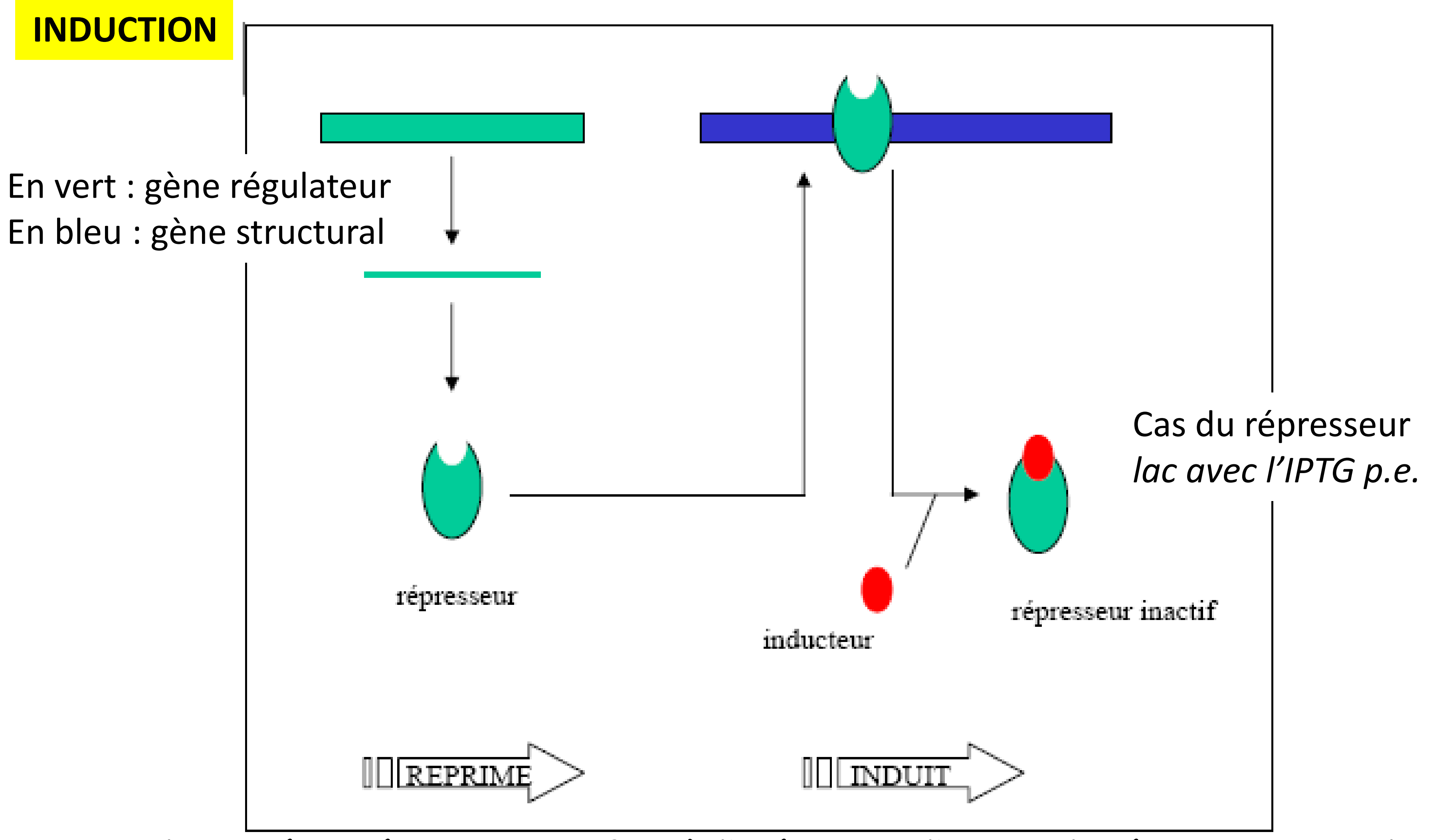
- **Gène de structure** : code une protéine structurale, une enzyme ou une protéine régulatrice.

- **Gène de régulation** : code une protéine impliquée dans la régulation d'expression d'autre gène.

2.2.Contrôles positif-négatif

LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST NEGATIF:

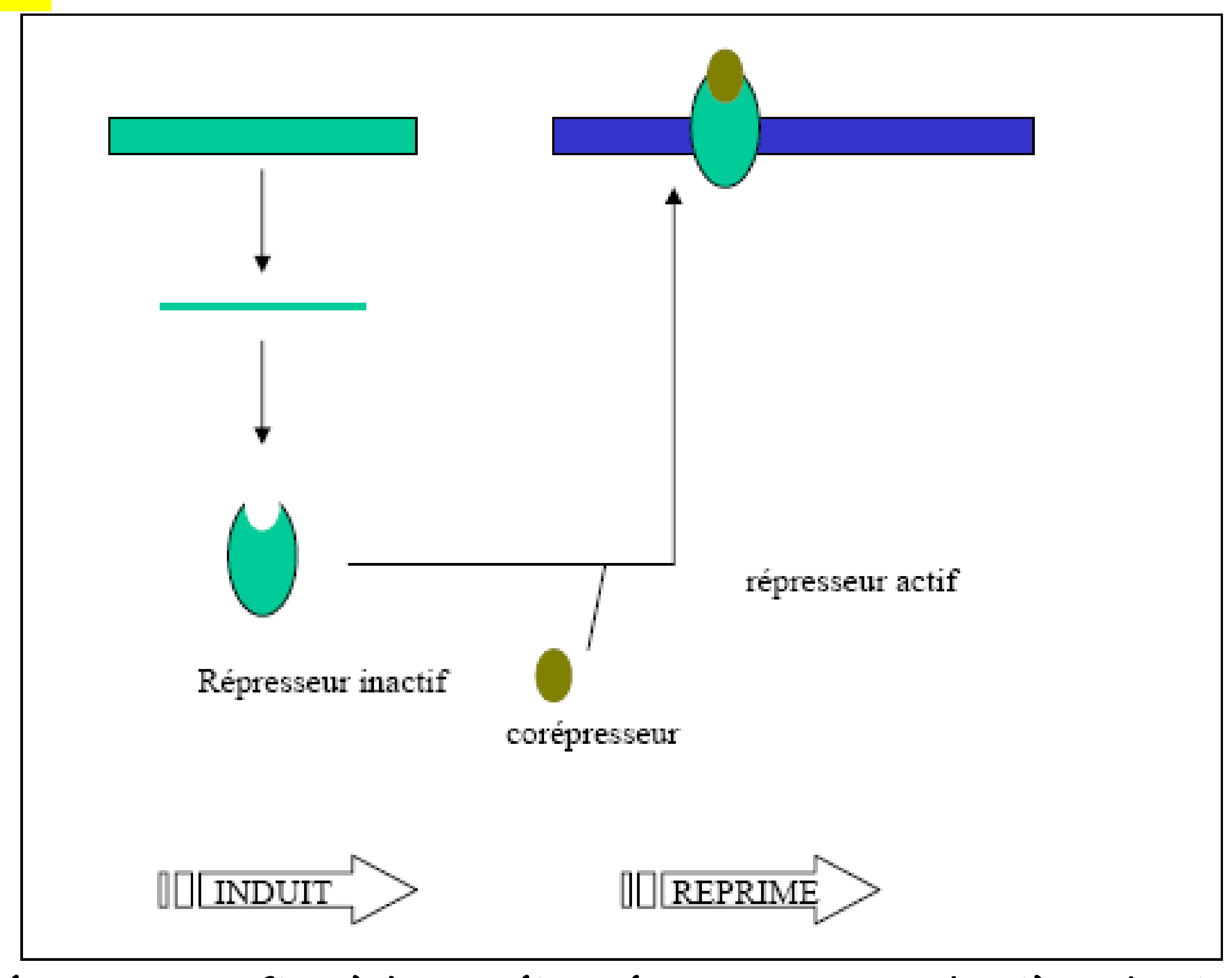
INDUCTION



Lorsque la protéine répresseur se fixe à l'opérateur, l'ARN polymérase ne peut plus initier la transcription ce qui empêche l'expression du gène.

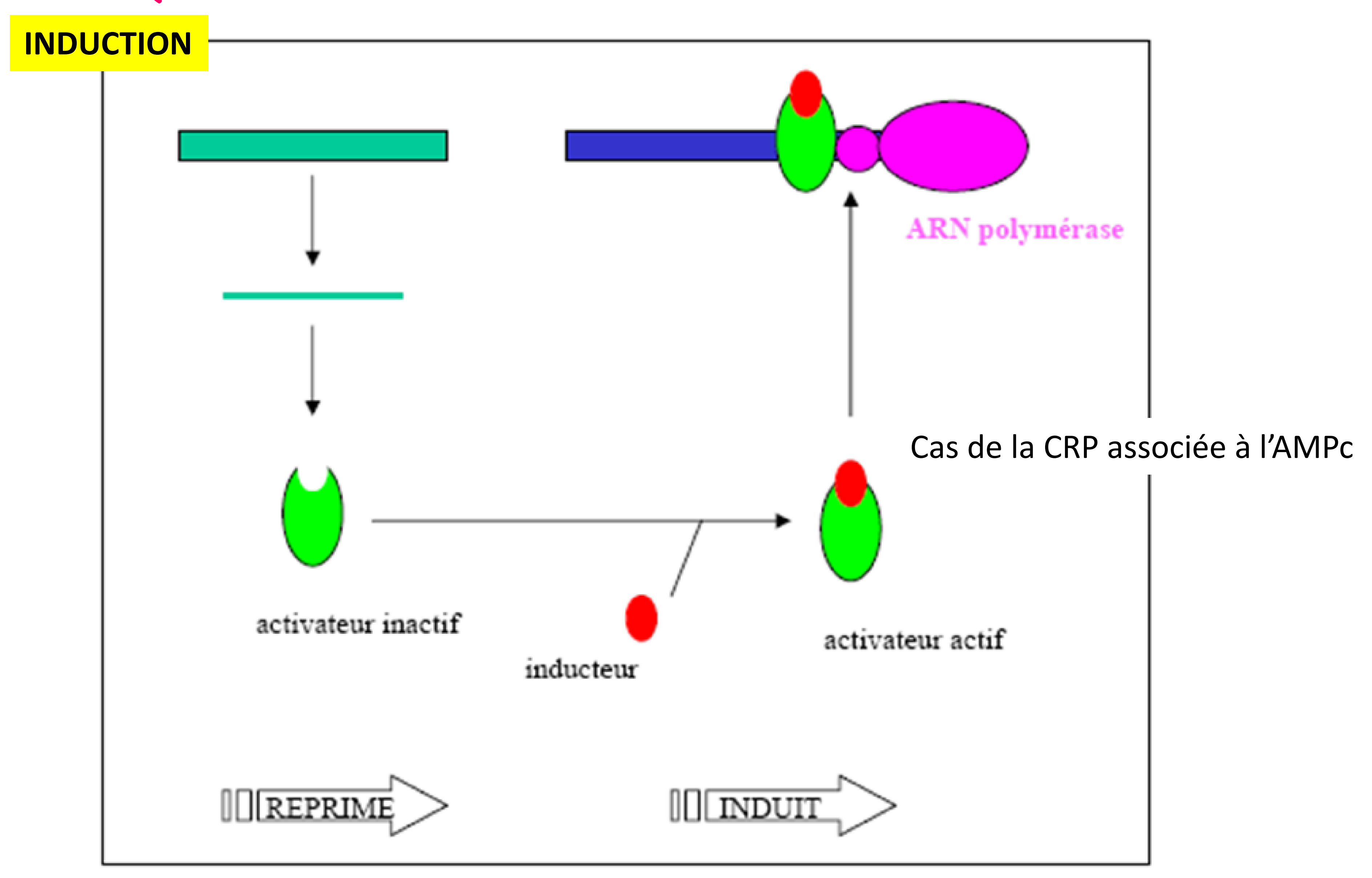
LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST NEGATIF:

REPRESSION



Lorsque le co-répresseur se fixe à la protéine répresseur cette dernière s'active et se fixe à l'opérateur , l'ARN polymérase ne peut plus initier la transcription ce qui empêche l'expression du gène.

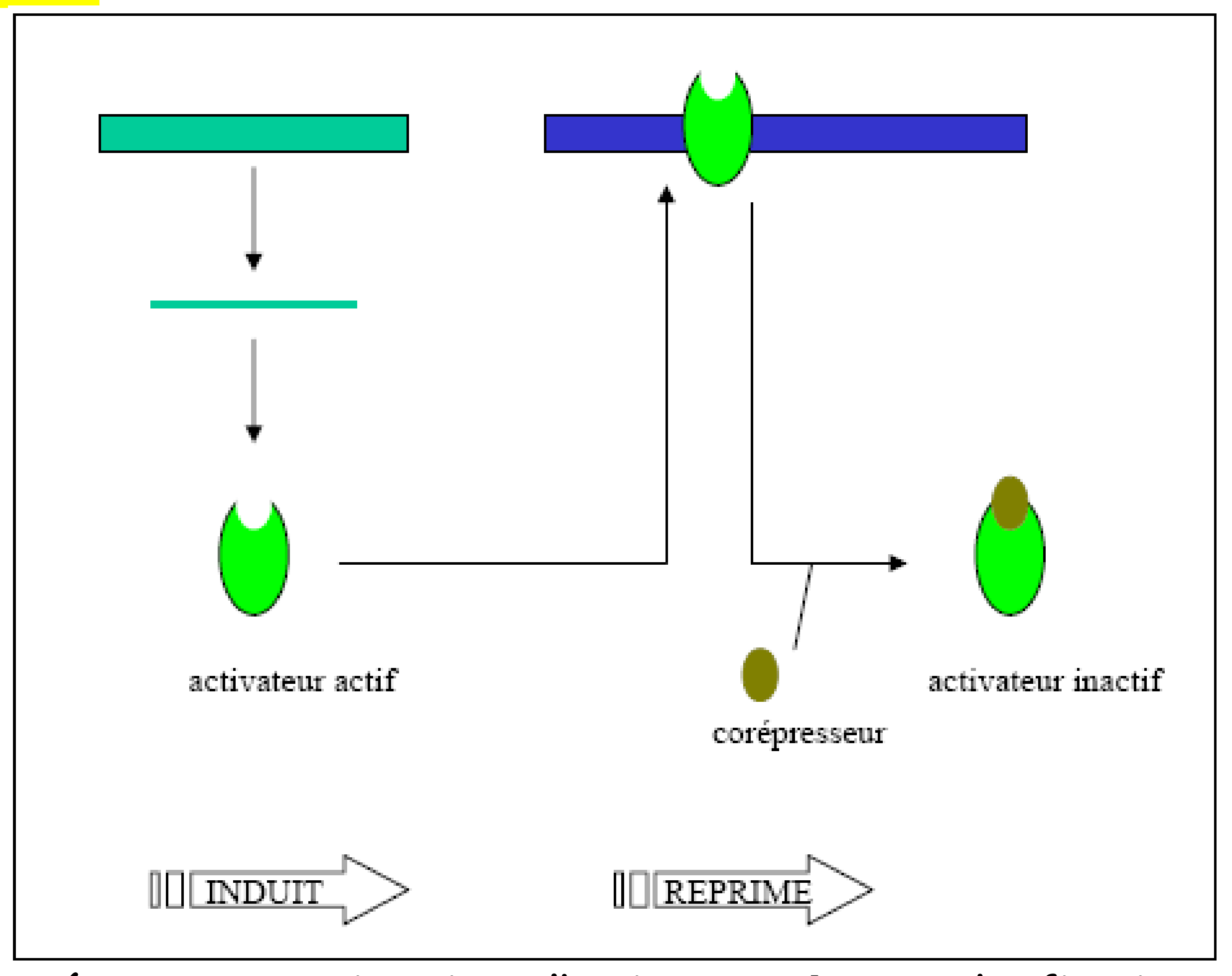
LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST POSITIF:



Un facteur de transcription doit assister l'ARN polymérase pour l'initiation au niveau du promoteur.

LORSQUE LE CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION EST POSITIF:

REPRESSION



Un corépresseur va inactiver l'activateur → pas de fixation de l'ARN polymérase au niveau du promoteur →pas de transcription.

En résumé

Contrôle négatif : le répresseur inactive la transcription

Contrôle positif : l'activateur active la transcription

Opéron inductible:

avec inducteur:

activation de la transcription

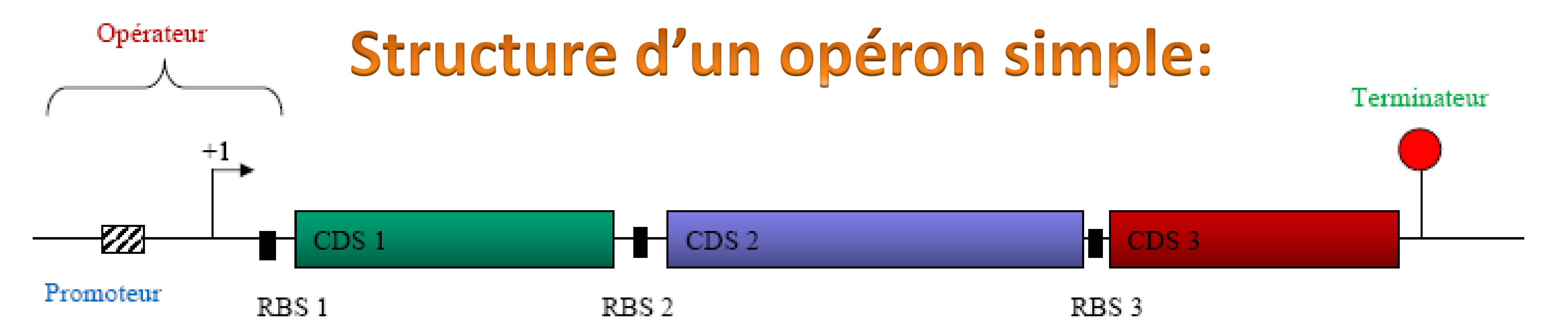
Opéron répressible:

avec corépresseur:

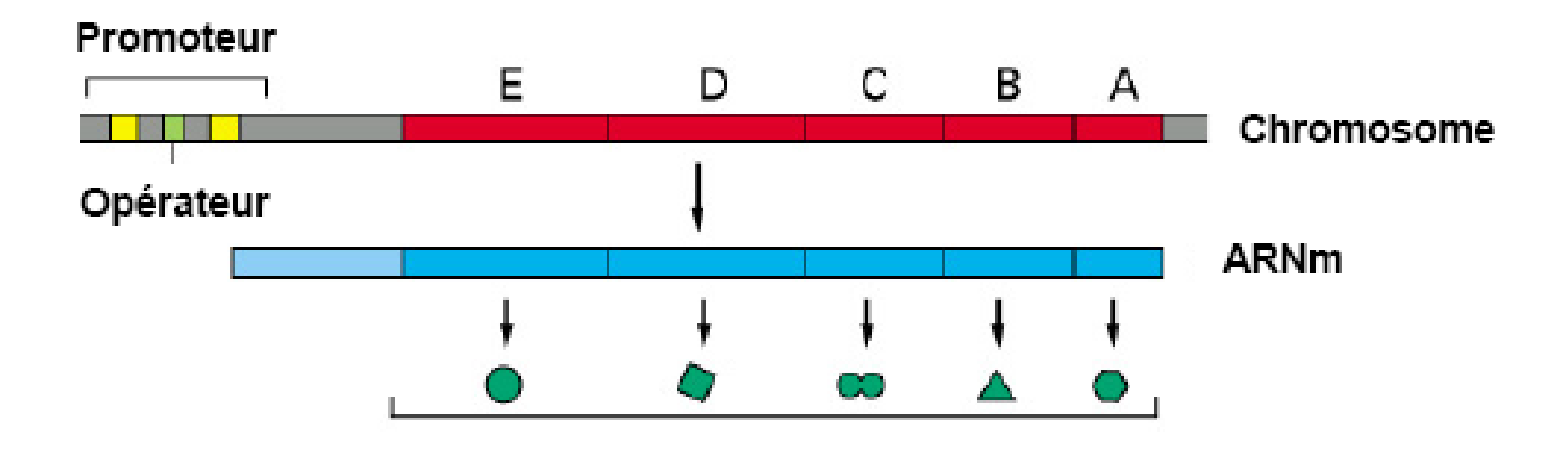
inhibition de la transcription

2.3.Notion d'opéron

- généralement trouvés chez les procaryotes, avec quelques exemples maintenant connus chez les eucaryotes (Némathelmintes , Plathelminthes).
- chez les bactéries, quand un promoteur sert une série de gènes groupés, l'ensemble de gènes s'appelle un ***opéron***.



Opérateur : contrôle de la transcription
Promoteur : fixation de l'ARN polymérase
+1 : début de la transcription
RBS ('ribosome binding site') : fixation du ribosome
CDS ('coding sequence'): séquence codant pour une protéine
Terminateur : fin de la transcription



- tous ces gènes sont transcrits en un ARNm *simple*
- chaque section de ces ARNm (appelés *ARNm polycistroniques)* peut alors être traduite indépendamment
- les gènes d'un opéron donné codent souvent pour plusieurs enzymes actives dans une *même voie métabolique*

L'opéron lactose* (chez *E. coli*) un exemple d'opéron catabolique inductible négativement & positivement régulé

* lactose : disaccharide pouvant être utilisé comme source de carbone unique pour la croissance d'*E. coli.*

3.1.OPERON LAC: Définition et structure



1961 : Jacob et Monod décrivent comment des gènes adjacents impliqués dans le métabolisme du lactose sont régulés de façon coordonnée par un élément génétique localisé à proximité des gènes. Il y a des séquences d'ADN codant pour des produits agissant en trans ou en cis. **(prix Nobel de médecine et de physiologie en 1965)**

Quelques définitions…

- **Trans** : les produits sont libres de diffuser pour trouver une cible (activateur, répresseur)

- **Cis** : pour toute séquence d'ADN non transformée en une autre molécule, elle agit in situ et touche l'ADN auquel elle est liée (promoteur et opérateur)

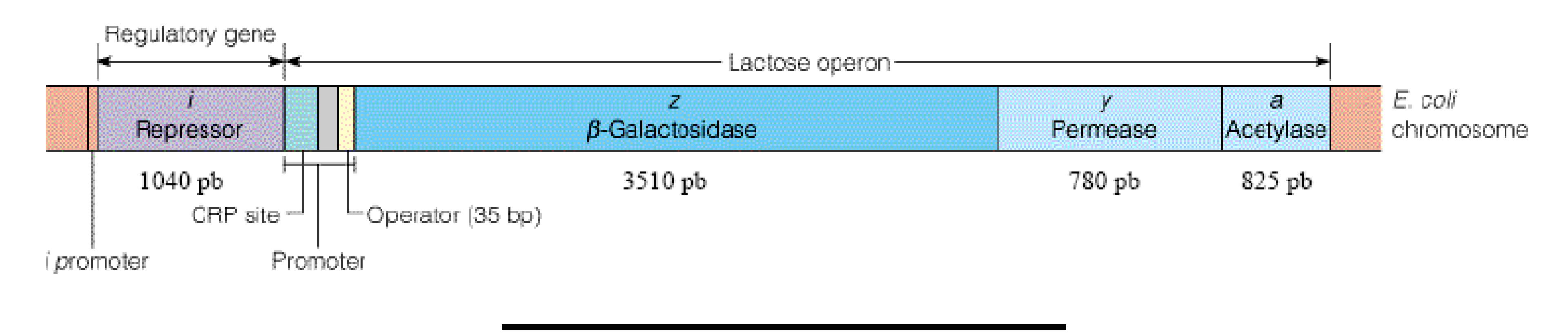
- **Opéron** : ensemble de gènes structuraux et d'éléments contrôlant leur expression : promoteur, opérateur et un gène régulateur.

Les opérons produisent des ARNm qui codent pour des protéines fonctionnellement reliés.

Exemple de l'opéron Lac:

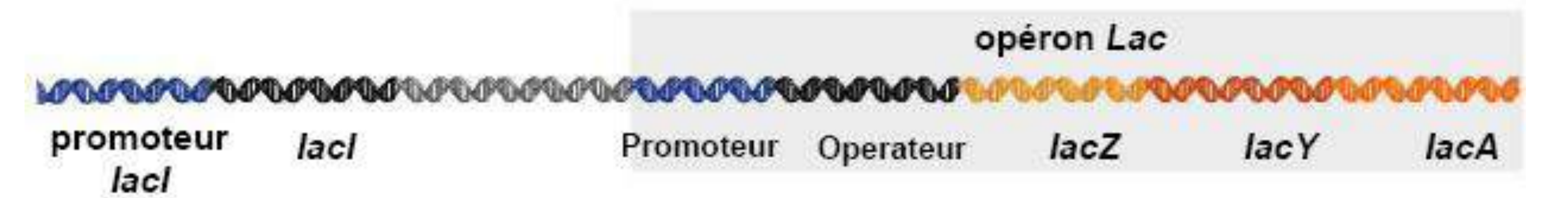
ARNm "Polycistronique"
message *lacZ*
message *lacY*
message *lacA*
L'ARN polymérase lie le promoteur
Promoteur
Opérateur
lacZ
lacY
lacA

L'opéron *lac* : organisation



3 gènes structuraux: ***z*, *y* & *a***

- codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du lactose
- sont exprimés continuellement à faible taux
- sont induits environ 1000 fois quand le lactose est présent
- sont modulés par le taux de glucose du milieu



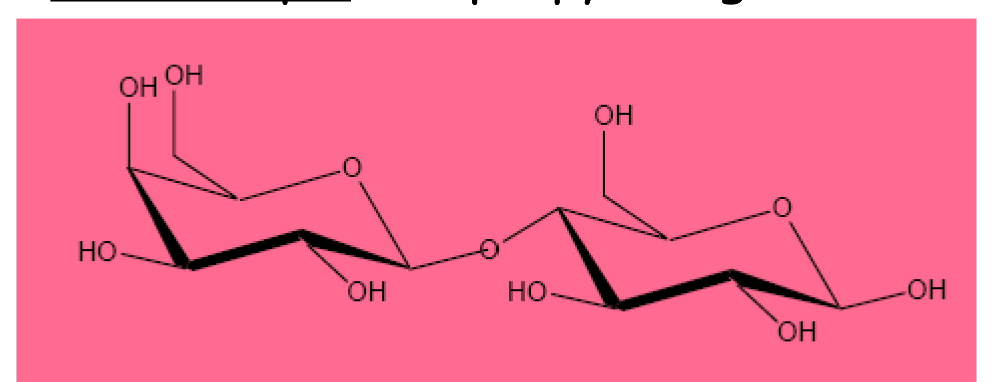
- *Le gène lacZ encode l'enzyme **β-galactosidase**, qui décompose le lactose (en galactose et glucose)*
- *Le gène lacY encode la galactosidase **perméase**, une protéine de transport pour le lactose.*
- *Le gène lacA encode la **thiogalactoside acétyltransférase**.*
- *Le gène **lacI** (gène adjacent n'appartenant pas à l'opéron) encode un **répresseur** qui bloque la transcription de l'opéron lactose.*

Les enzymes du métabolisme du lactose sont inductibles

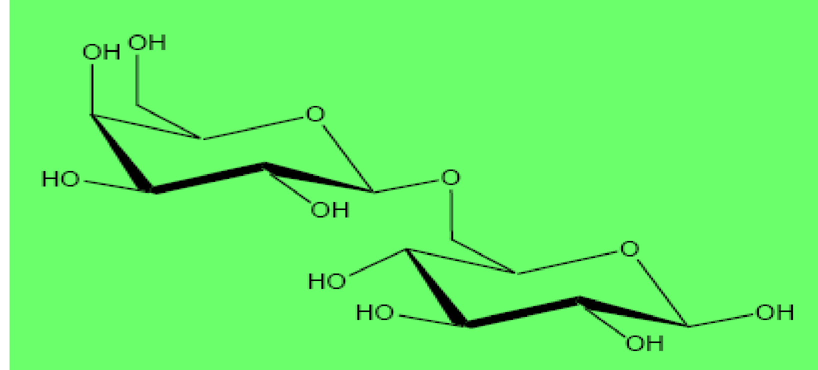
Les inducteurs de l'opéron lac

- **Lactose**, (substrate de l'opéron), converti en son isomère (par transglycosylation), l'allolactose.
- **Allolactose**, inducteur naturel (ou inducteur physiologique, isomère du lactose).
- **Inducteur gratuit** : induit l'opéron mais pas métabolisé.

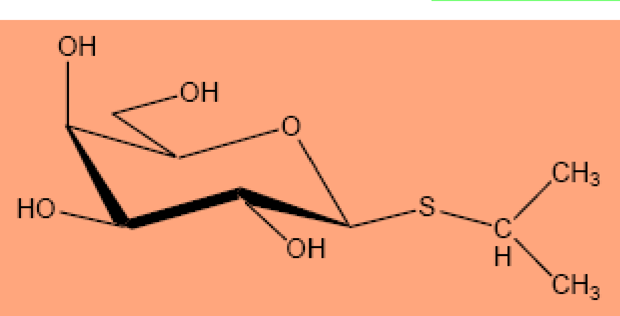
<u>Par exemple</u> : isopropylthiogalactoside (IPTG)



Lactose

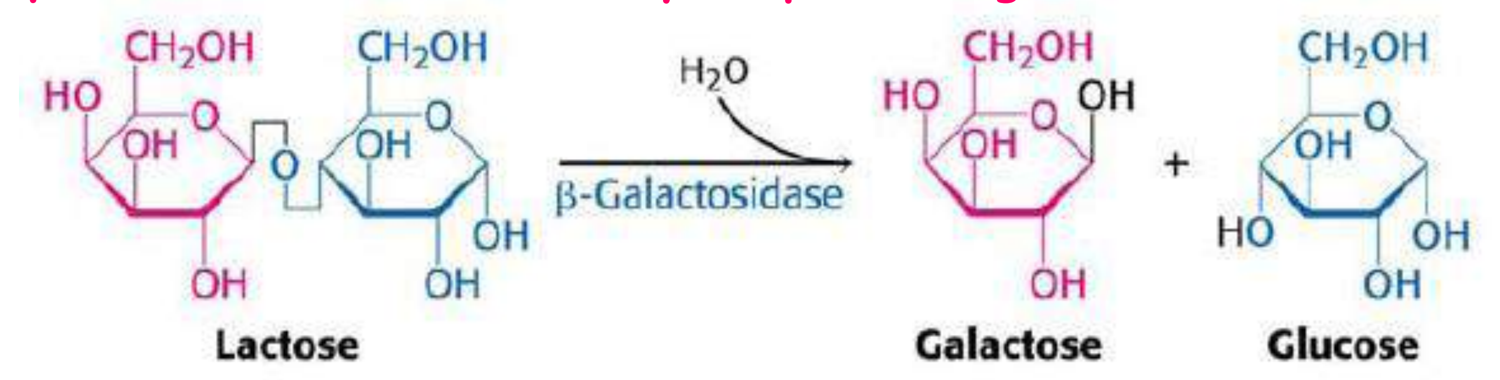


Allolactose

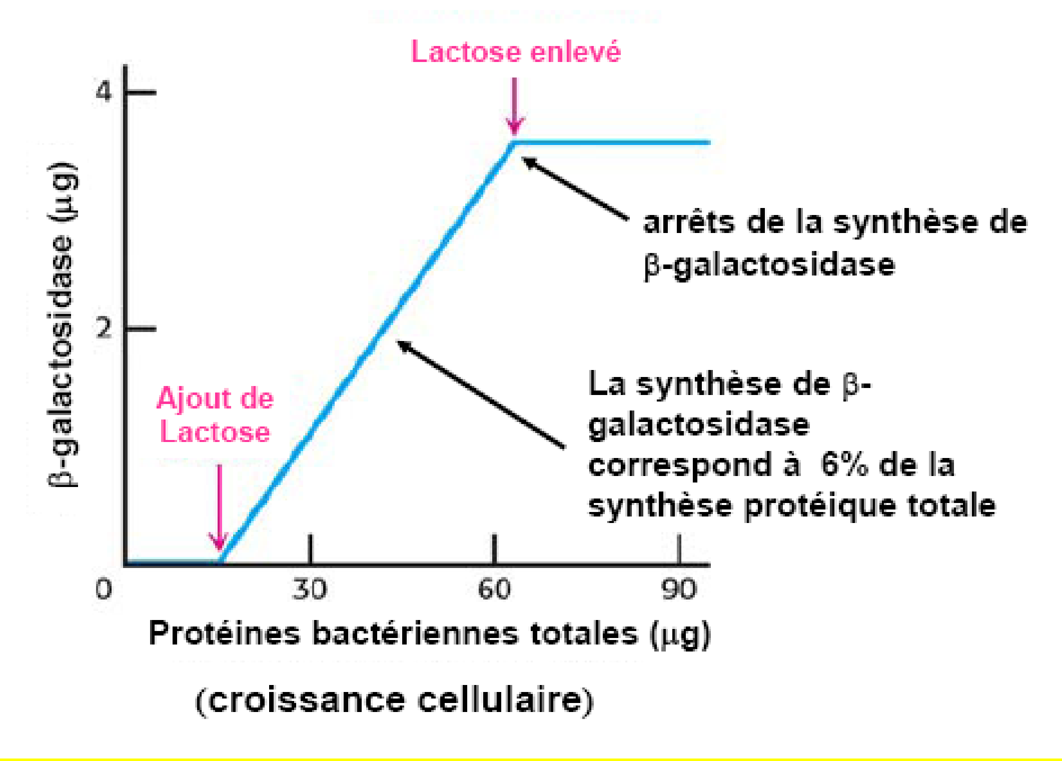


IPTG ou isopropylthiogalactoside

Equation de la réaction catalysée par la β-galactosidase:

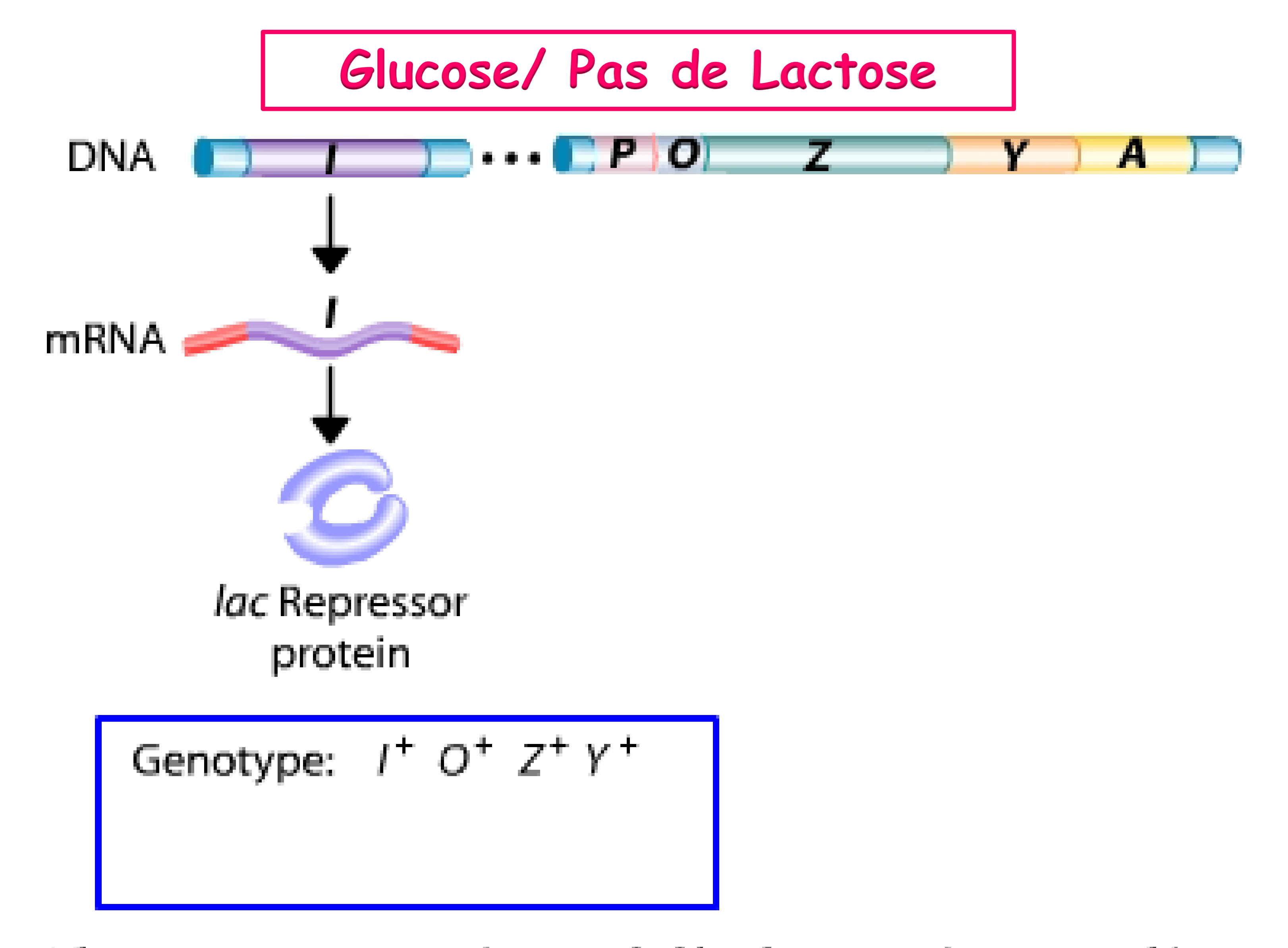


Cinétique d'induction de l'activité β-galactosidase chez *E. coli* :



L'augmentation de la synthèse de β-galactosidase se produit seulement en l'absence des sources préférées de carbone/énergie telles que le glucose

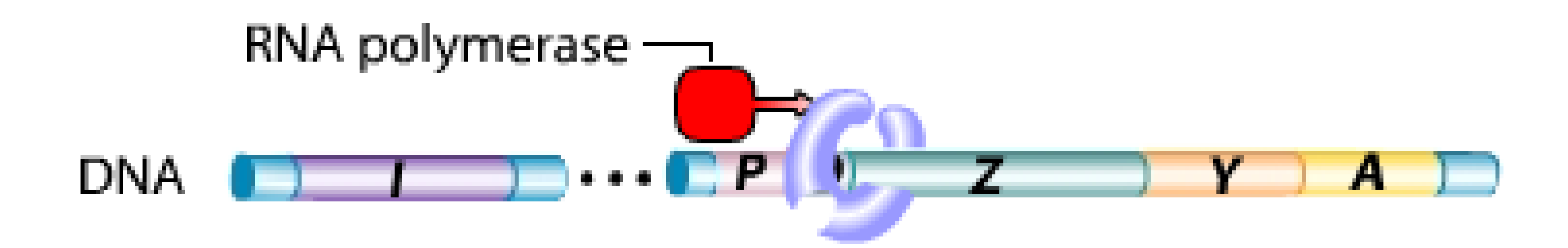
3.1.OPERON LAC: Fonctionnement



DNA I ... P Z Y A

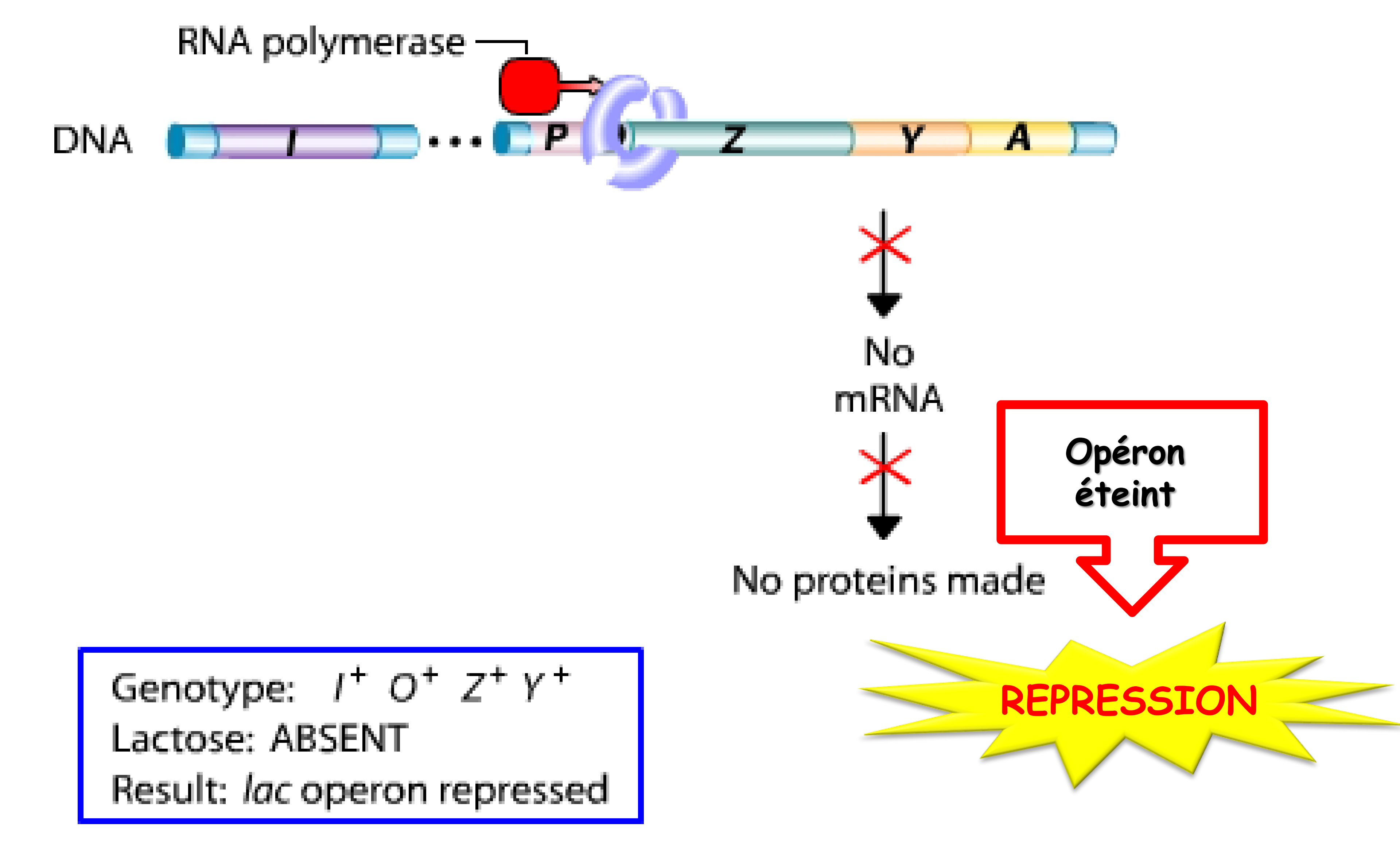
Genotype: I^{+} O^{+} Z^{+} Y^{+}
Lactose: ABSENT

In the absence of lactose, the Lac repressor binds to the *lac* operator site.



Genotype: I^+ O^+ Z^+ Y^+
Lactose: ABSENT

Repressor binding to the operator blocks progression of RNA polymerase, like a DNA roadblock.



Since RNA polymerase is unable to transcribe the *lac* structural genes, the corresponding proteins are not made.



DNA I • • • P O Z Y A

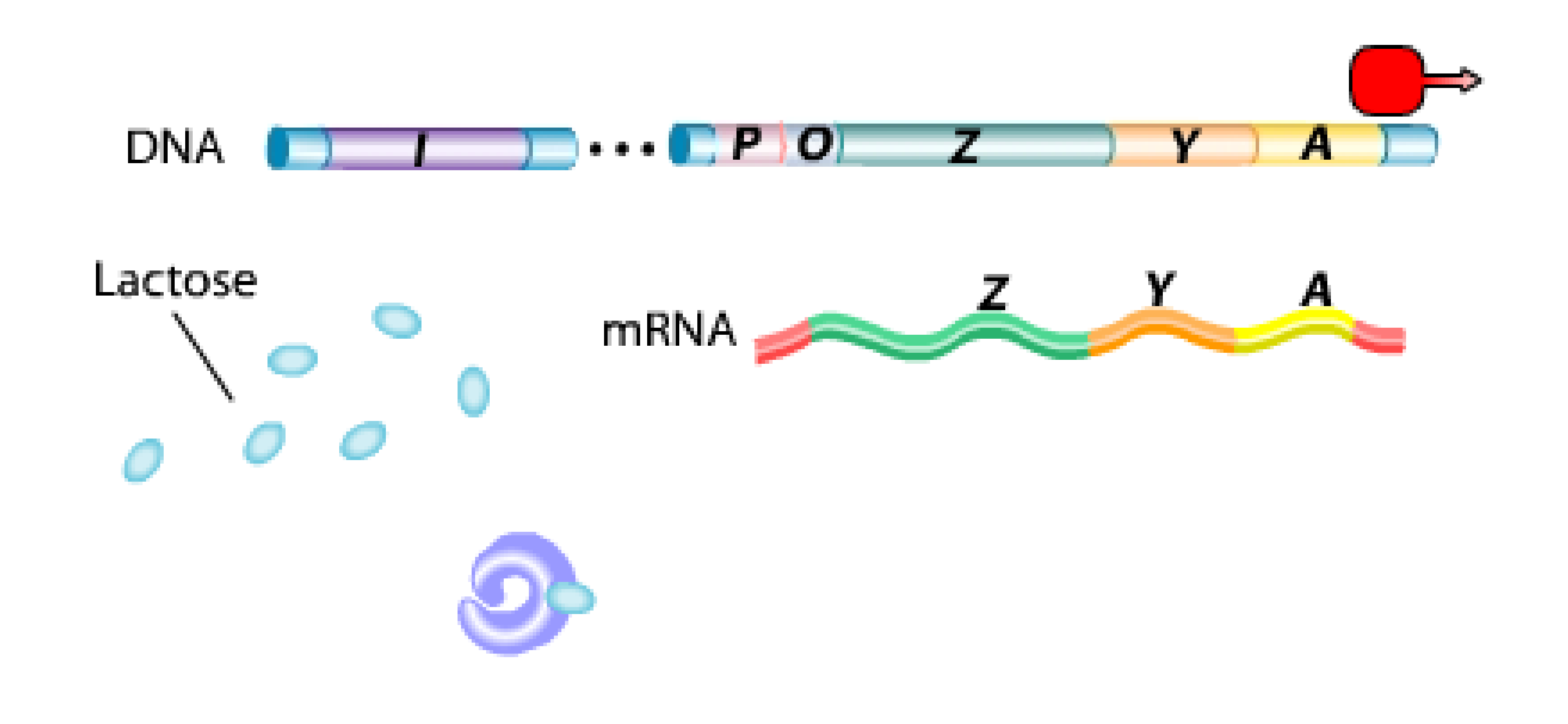


In this conformation, the repressor can no longer bind to the *lac* operator site.

Genotype: I^+ O^+ Z^+ Y^+

Lactose: PRESENT

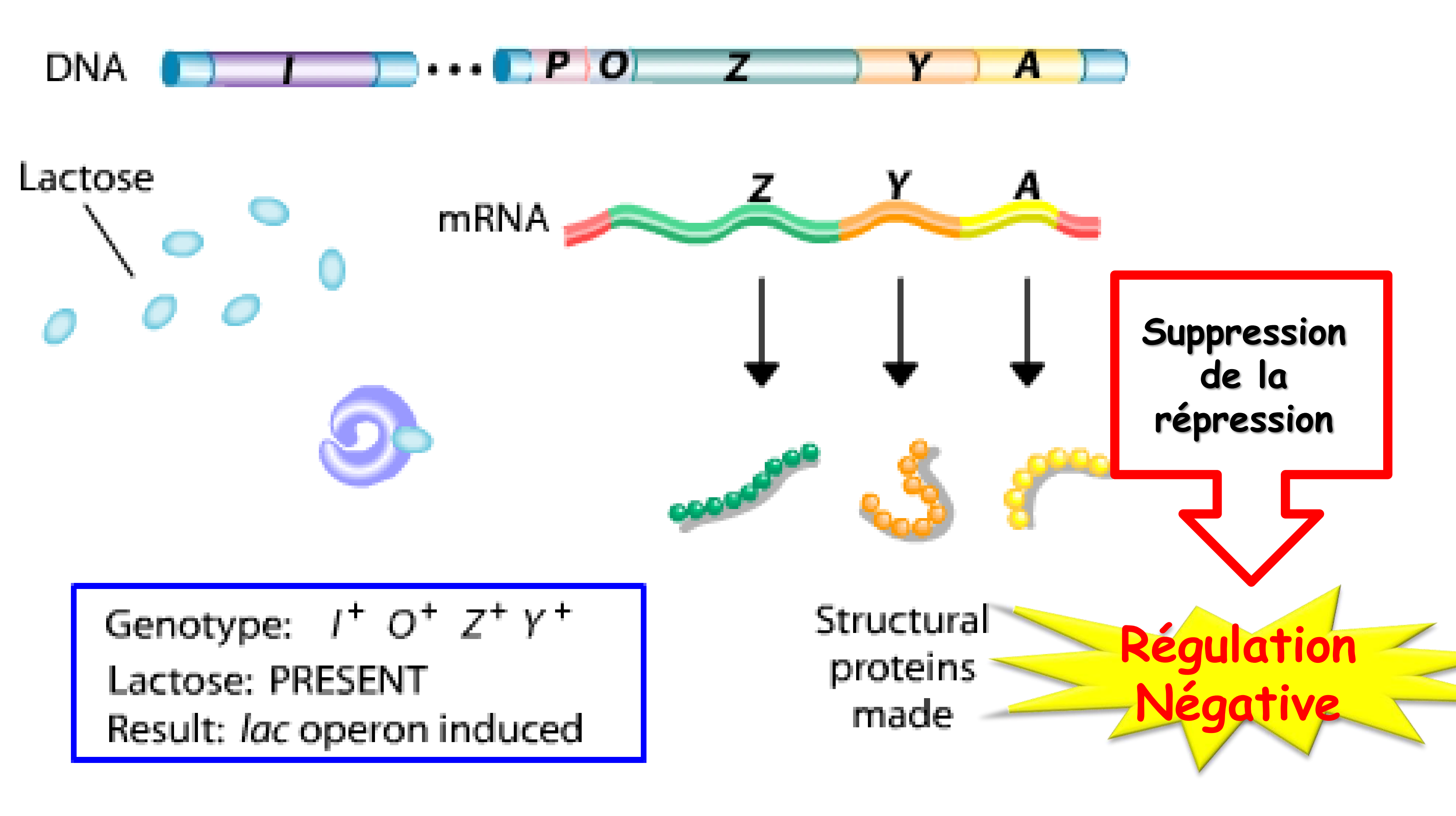
When lactose is present in the cell medium, it binds to the allosteric site of the Lac repressor. This changes the conformation of the repressor.



Genotype: I^{+} O^{+} Z^{+} Y^{+}

Lactose: PRESENT

Without the repressor blocking its way, RNA polymerase is able to transcribe the structural genes.



Thus, in the presence of lactose, the *lac* structural genes are expressed. The proteins encoded by the *Z* and *Y* genes are required for the metabolism of lactose.

& s'il y a les 2 Glucose/ Lactose ...?!

En général:

glucose disponible comme source d'énergie

↓

utilisation préférentielle/autres sucres

↓

Empêchement de l'expression de plusieurs opérons (lactose, galactose et arabinose)

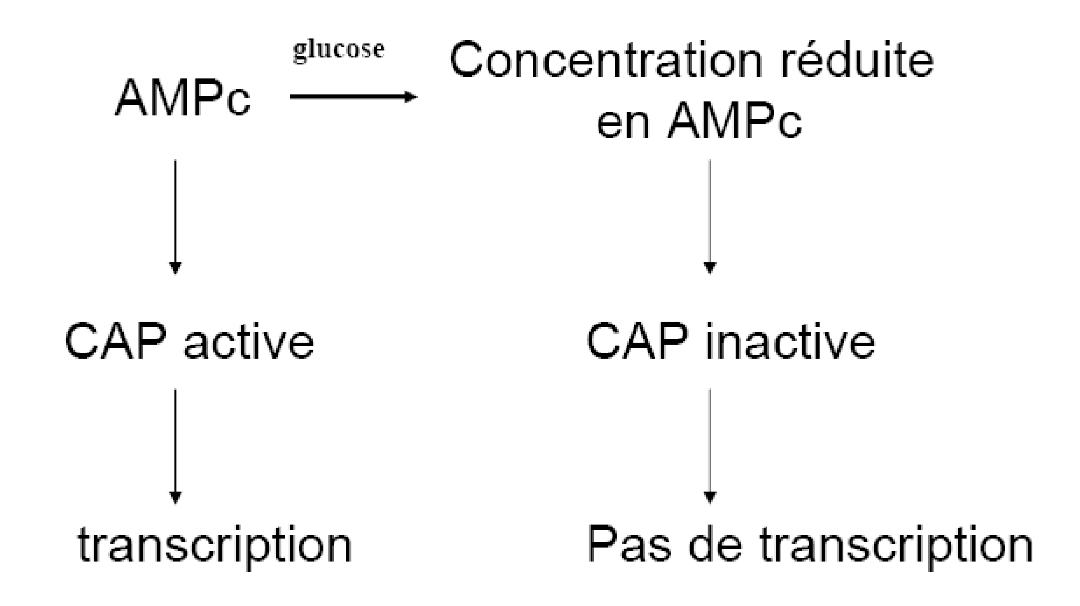
↓

=**Répression des catabolites**

La répression des catabolites fait intervenir une **régulation positive** au niveau du promoteur.

COMMENT?

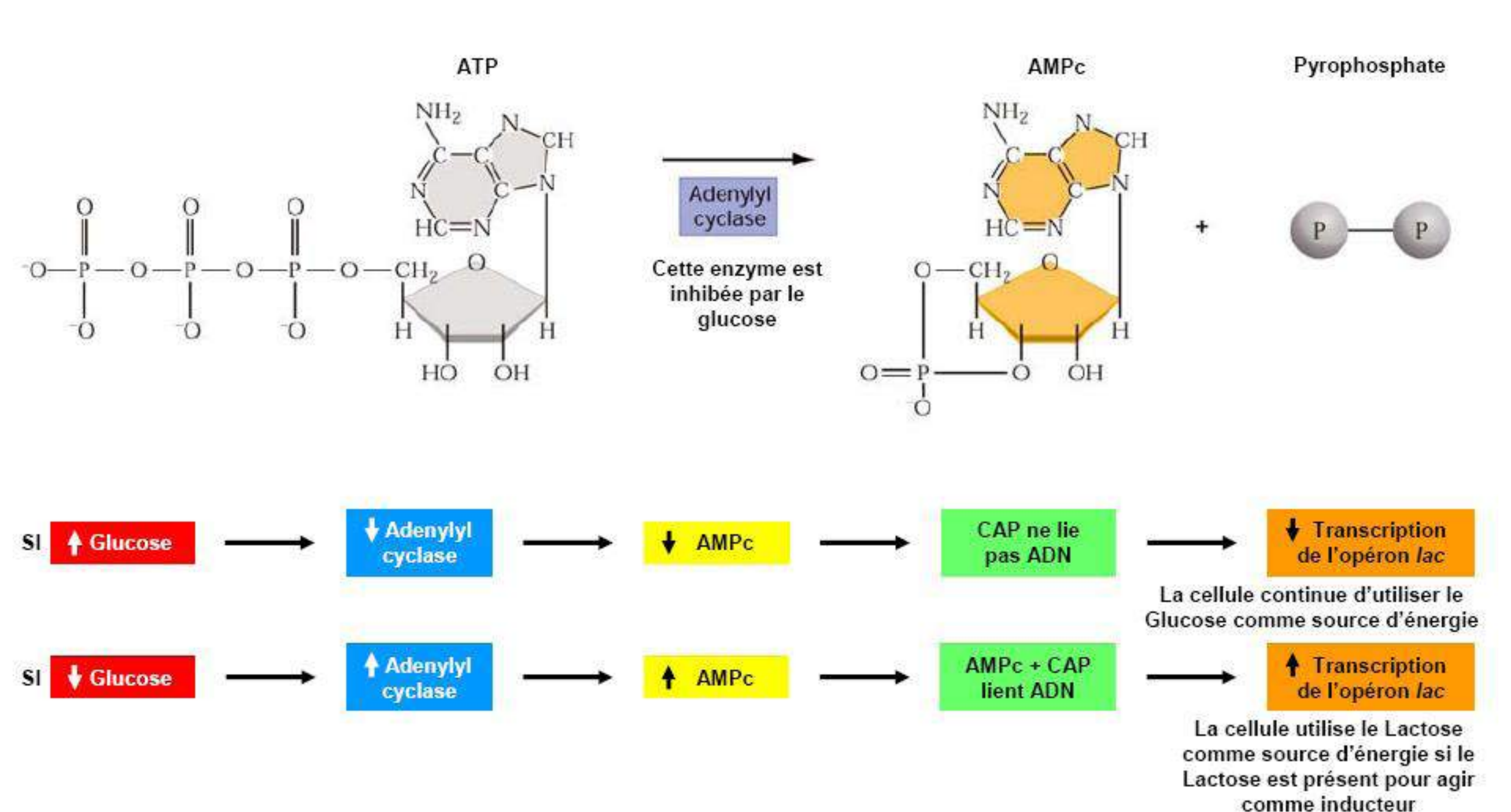
Le glucose entraîne une répression des catabolites en diminuant la concentration de l'AMPc.



➡ **Peu de glucose => beaucoup d'AMPc => AMPc-CAP active => liaison à l'ADN => transcription: utilisation des autres sucres**

➡ **beaucoup de glucose => peu d'AMPc => CAP inactive => pas de transcription => utilisation du glucose**

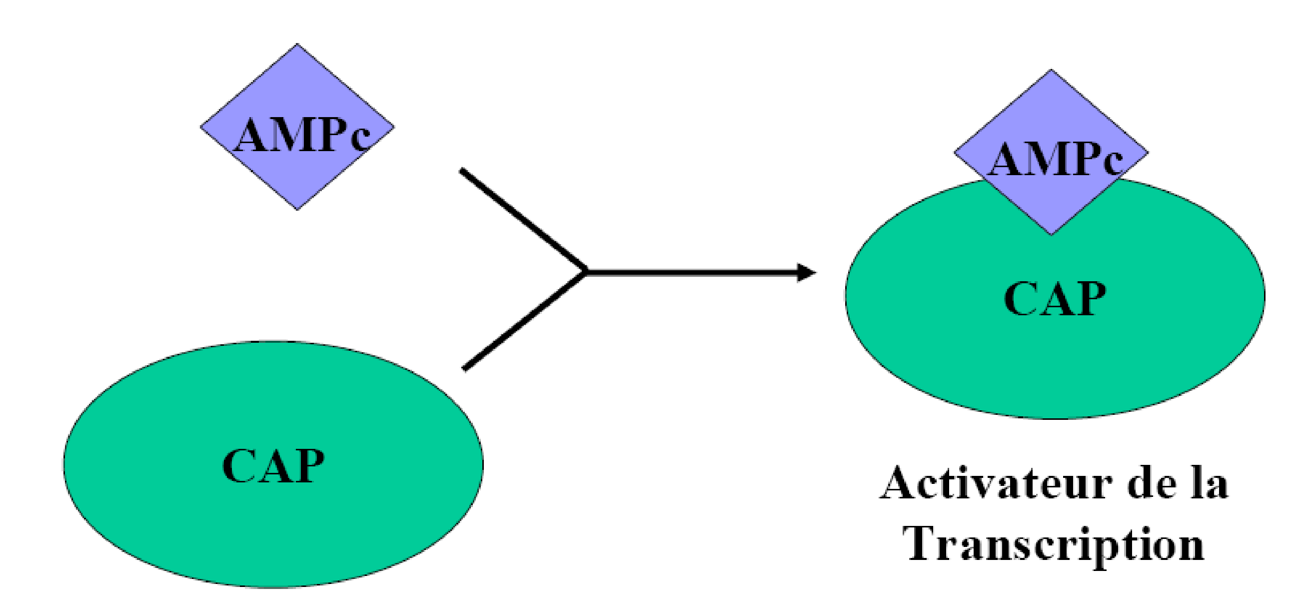
En effet:



ATP
AMPc
Pyrophosphate
Adenylyl cyclase
Cette enzyme est inhibée par le glucose
SI ↑ Glucose
↓ Adenylyl cyclase
↓ AMPc
CAP ne lie pas ADN
↓ Transcription de l'opéron *lac*
La cellule continue d'utiliser le Glucose comme source d'énergie
SI ↓ Glucose
↑ Adenylyl cyclase
↑ AMPc
AMPc + CAP lient ADN
↑ Transcription de l'opéron *lac*
La cellule utilise le Lactose comme source d'énergie si le Lactose est présent pour agir comme inducteur

CAP?

La protéine CAP (Catabolite activator protein)



CAP = protéine activatrice des catabolites = facteur de contrôle positif

CAP interrompt les voies métaboliques alternatives lorsqu'elles sont rendues superflues par un apport de glucose.

CAP : ce qu'il faut retenir

1- active la transcription de plus de 100 promoteurs (=facteur de transcription global).

2- protéine d'environ 45 kDa qui se fixe à l'ADN sous la forme d'un dimère (2 sous-unités identiques).

3- le 1er des activateurs transcriptionnels a avoir été isolé (1970) et le 1er pour lequel la structure 3D a été déterminée.

4- en présence d'AMPc, forme un complexe (CRP-AMPc) qui se fixe à une séquence cible de 22pb, située près ou au sein du promoteur qu'il contrôle

5- active la transcription du fait de contacts protéine-protéine avec l'ARN polymérase

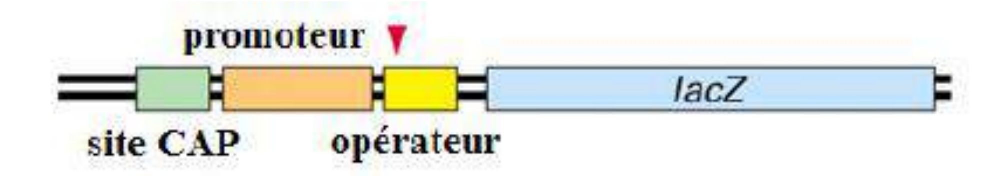
RECAPITULATIF

3 Scénarios :

1- Pas de lactose présent
L'opéron est "éteint" → pas d'ARNm synthétisé

2- Lactose présent; glucose présent également
La présence du lactose inactive le répresseur → il y a Transcription
(Parce que le Glucose est présent → cAMP est faible → CRP ne peut aider la transcription)

3- Lactose présent; pas de glucose
la présence de lactose inactive le répresseur → il y a Transcription
(Il n'y a pas de Glucose → [cAMP] est élevée → cAMP se fixe à la CRP *(activation) → CRP se fixe & 'aide' la transcription* : Niveau élevé de transcription



(a)

CAP

Pol-σ70

CAP est un régulateur positif et l'AMPc la molécule inductrice

répresseur lac

– lactose

+ glucose

faible [AMPc]

lacZ

pas de transcription

lactose

(b)

Le produit du gène I (répresseur lac) est un régulateur négatif; le lactose ou l'IPTG la molécule inductrice.

+ lactose

+ glucose

faible [AMPc]

lacZ

faible transcription

(c)

AMPc

+ lactose

– glucose

fort [AMPc]

lacZ

forte transcription

3.1.OPERON LAC: Mutations

Analyse génétique de l'opéron

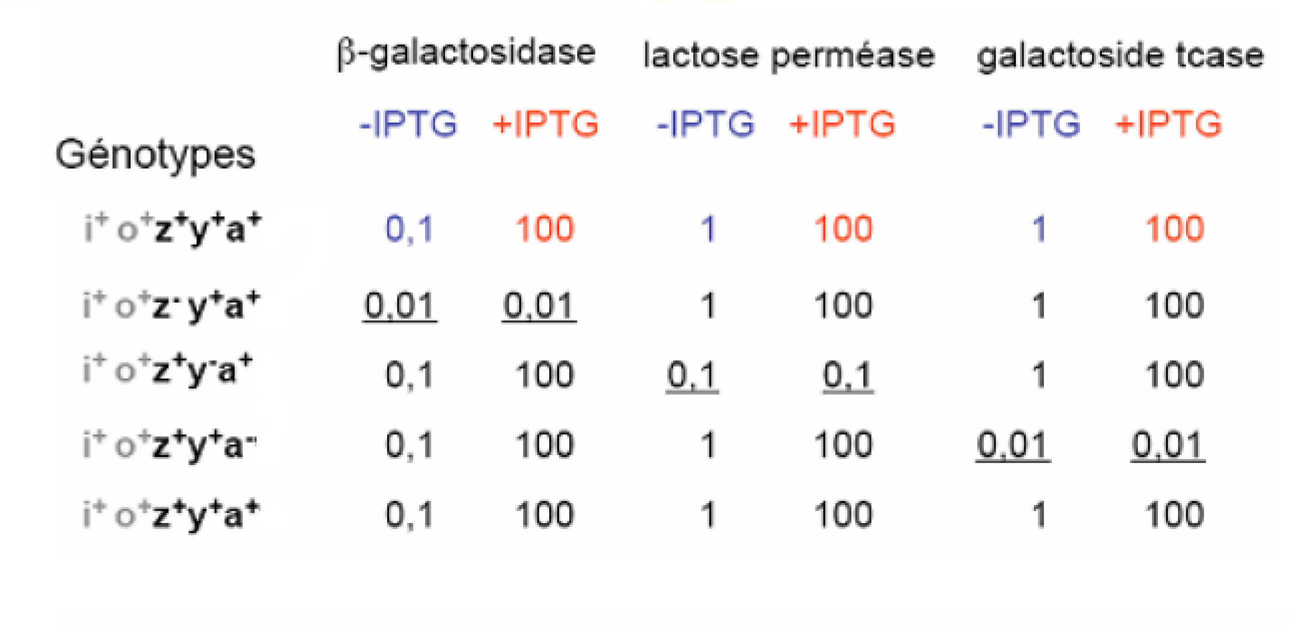
Quels sont les éléments essentiels du système de régulation ?

La génétique a joué un rôle décisif dans la compréhension du fonctionnement de l'opéron lac.

OBJECTIF:
→ évaluer les changements qui se produisent dans la spécificité de l'un ou l'autre des intervenants du système en réalisant des **MUTATIONS**.

les 3 gènes lacZ, lacY et lacA ont une régulation commune

En absence de lactose:			En présence de lactose:		
	β-galactosidase	↘		β-galactosidase	↗
	lactose perméase	↘		lactose perméase	↗
	galactoside transacétylase	↘		galactoside transacétylase	↗

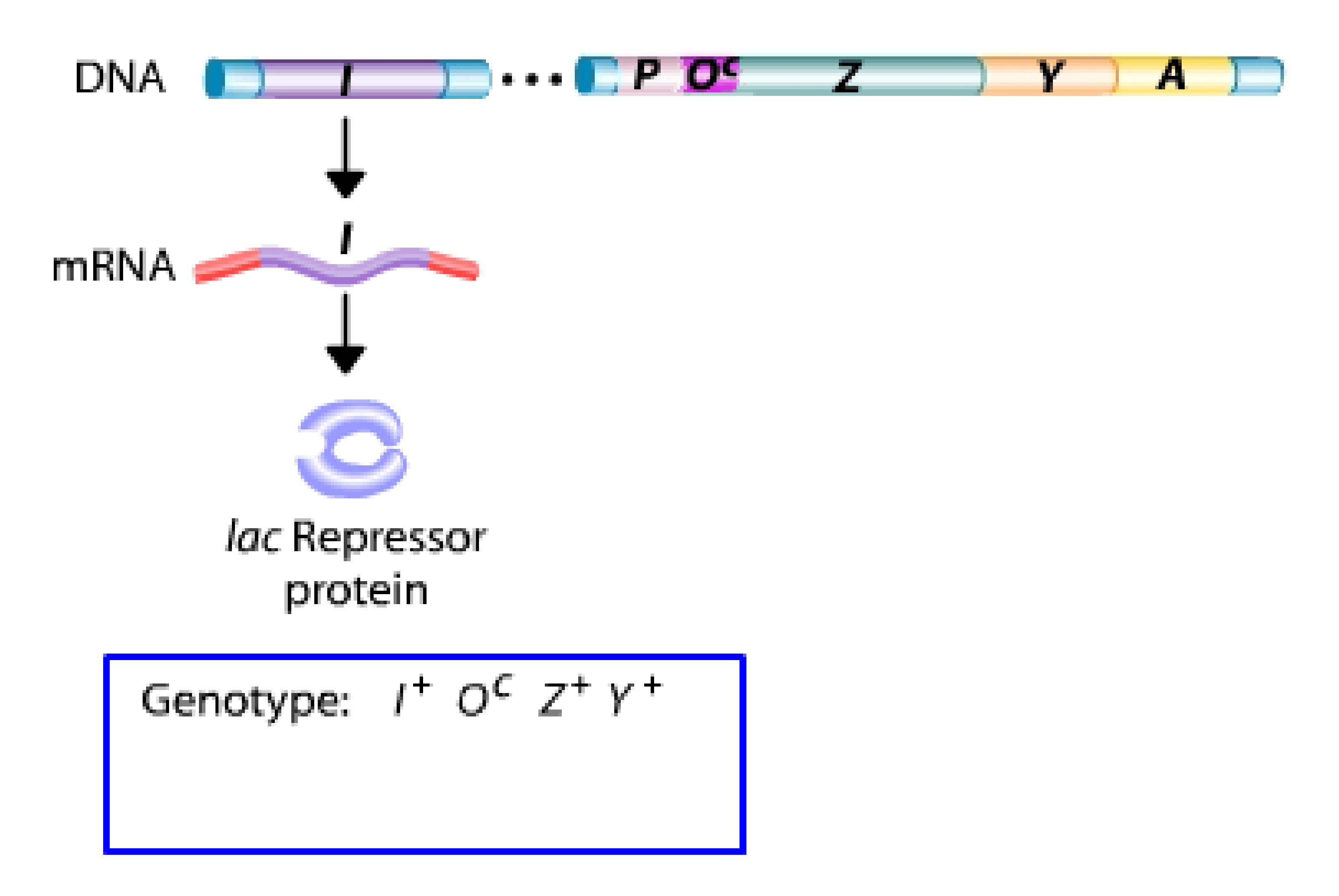


Génotypes	β-galactosidase -IPTG	β-galactosidase +IPTG	lactose perméase -IPTG	lactose perméase +IPTG	galactoside tcase -IPTG	galactoside tcase +IPTG
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^+$	0,1	100	1	100	1	100
$i^+ o^+ z^- y^+ a^+$	0,01	0,01	1	100	1	100
$i^+ o^+ z^+ y^- a^+$	0,1	100	0,1	0,1	1	100
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^-$	0,1	100	1	100	0,01	0,01
$i^+ o^+ z^+ y^+ a^+$	0,1	100	1	100	1	100
$i^- o^+ z^+ y^+ a^+$	100	100	100	100	100	100
$i^+ o^c z^+ y^+ a^+$	25	95	15	100	10	100

régulation commune des 3 gènes sous contrôle de 2 locus régulateurs distincts: i et o

Analyse des mutants et diploïdes partiels

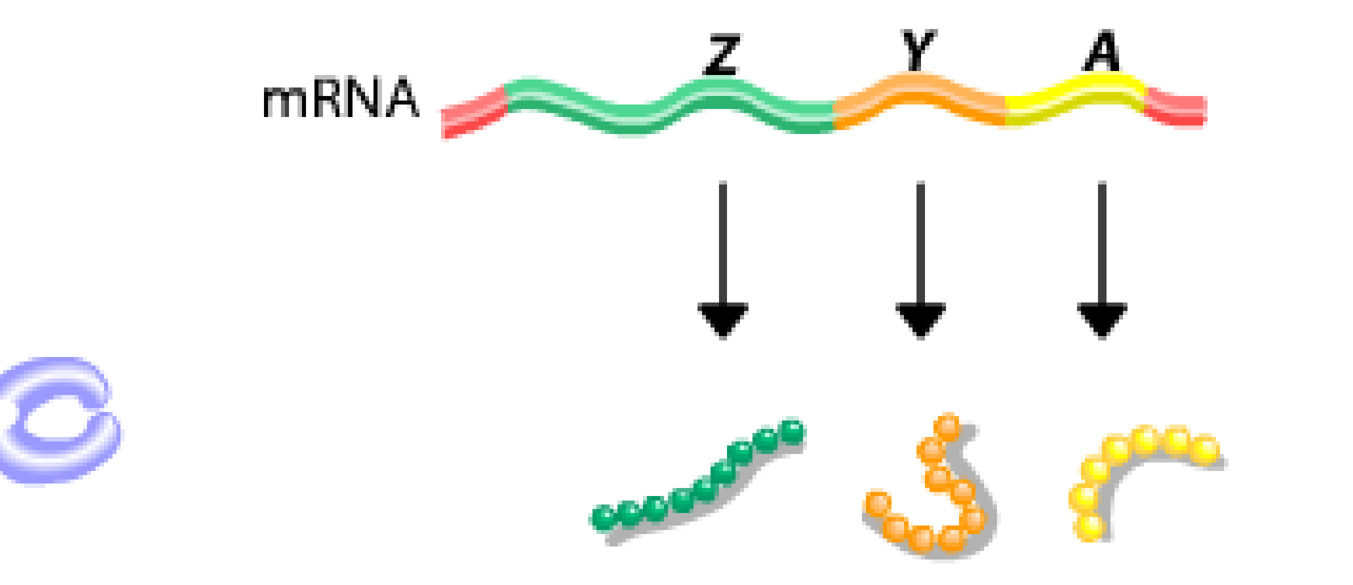
Opérateur Mutant = Mutation O^c



DNA I • • • P O^c Z Y A

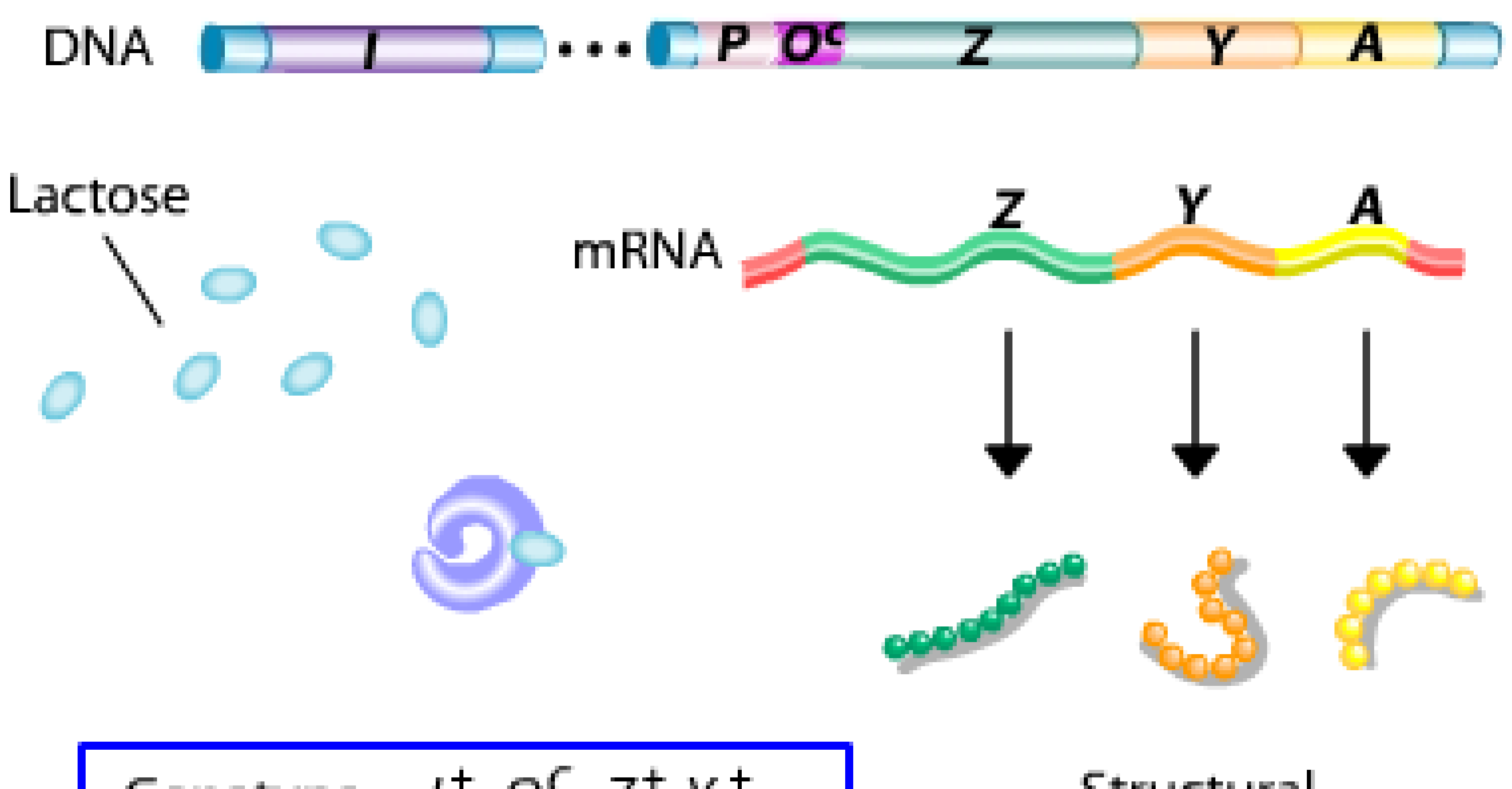
Genotype: $I^+ \ O^C \ Z^+ \ Y^+$





Genotype: I^+ O^C Z^+ Y^+
Lactose: ABSENT
Result: *lac* operon induced

Structural proteins made



Genotype: I^{+} O^{C} Z^{+} Y^{+}

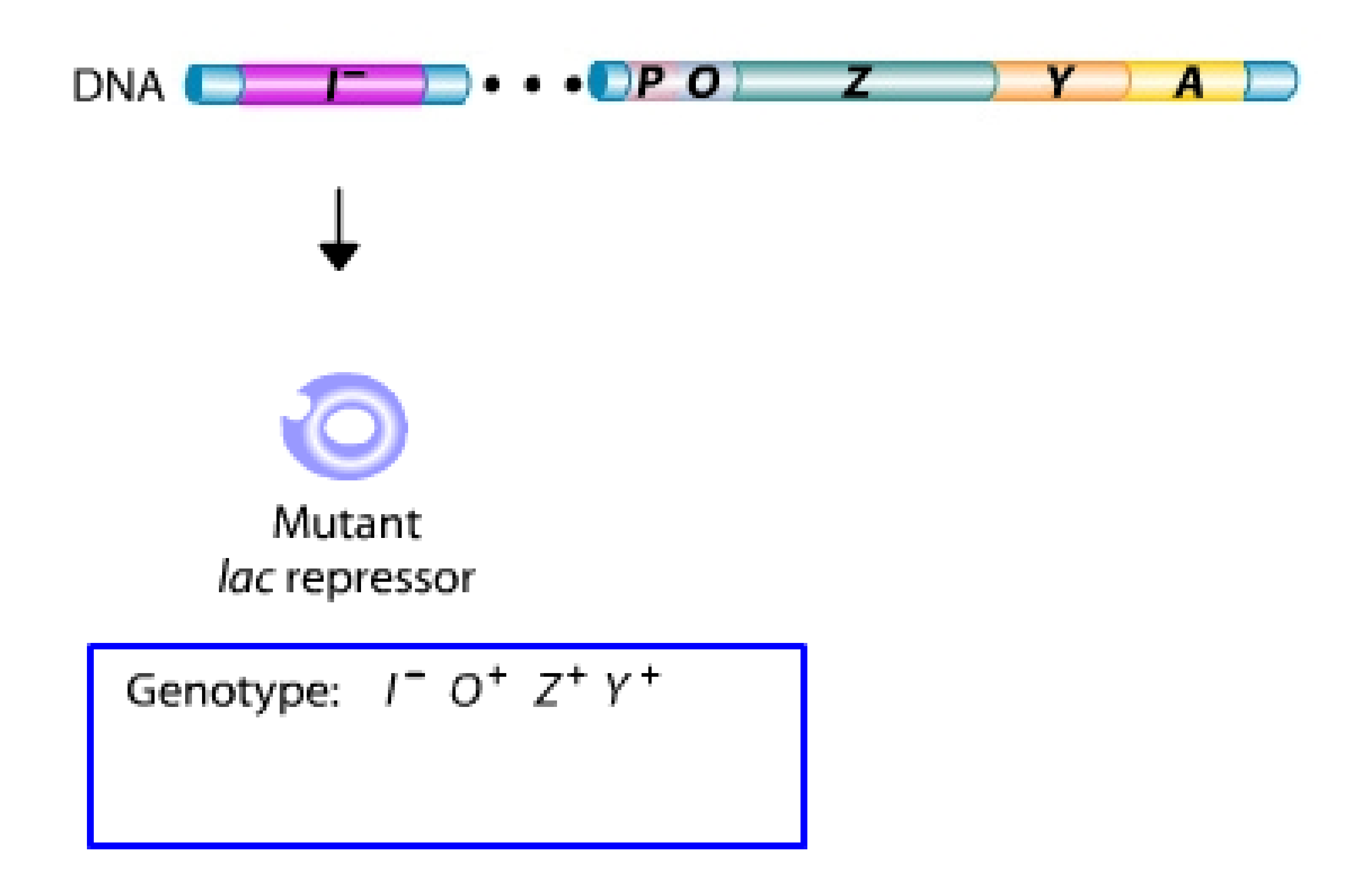
Lactose: PRESENT

Result: *lac* operon induced

Structural proteins made

	Lactose absent	Lactose present	
$I^+ O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon ON	
$I^+ O^C Z^+ Y^+$	operon ON	operon ON	→ O^C is constitutive

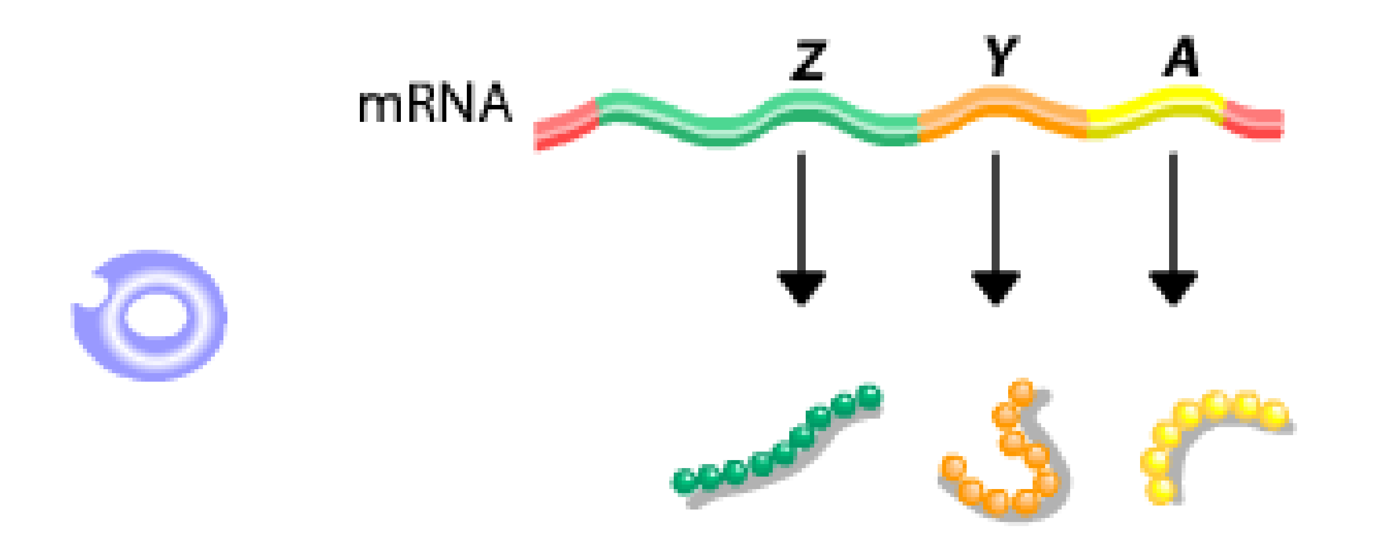
Lac I Mutant : Mutation I^-



DNA I^- • • • P O Z Y A

Genotype: $I^- \; O^+ \; Z^+ \; Y^+$





Genotype: $I^- \; O^+ \; Z^+ \; Y^+$
Lactose: ABSENT
Result: *lac* operon induced

Structural proteins made



DNA I^- • • • P O Z Y A

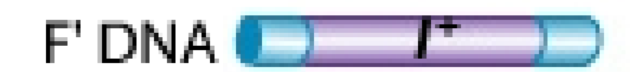
No mRNA

No proteins made

Genotype: $I^- \; O^+ \; Z^+ \; Y^+ / \; F \; I^+$

Lactose: ABSENT

Result: *lac* operon repressed



DNA I^- • • • P O Z Y A

Lactose

mRNA Z Y A

Structural proteins made

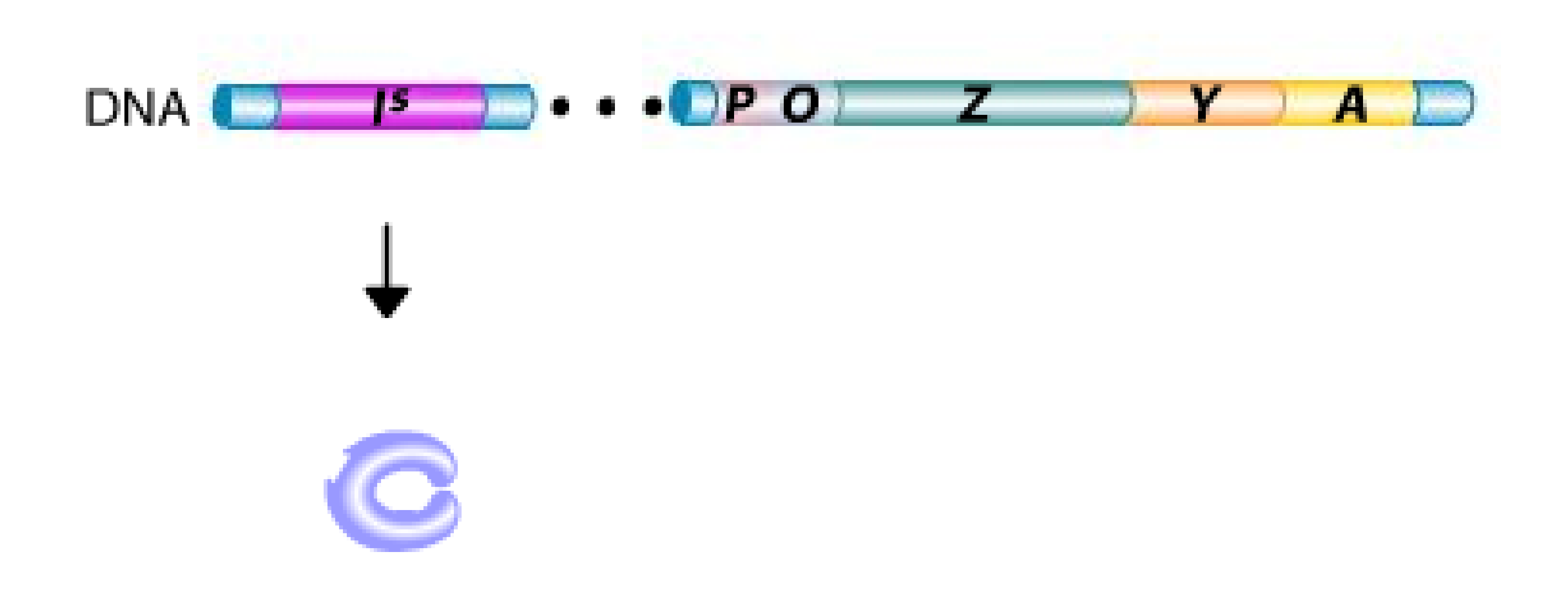
Genotype: $I^- \; O^+ \; Z^+ \; Y^+ / \; F \; I^+$

Lactose: PRESENT

Result: *lac* operon induced

	Lactose absent	Lactose present	
$I^+ O^+ Z^+ Y^+$	operon OFF	operon ON	
$I^- O^+ Z^+ Y^+$	operon ON	operon ON	I^- is constitutive
$I^- O^+ Z^+ Y^+ / F\ I^+$	operon OFF	operon ON	I^+ is dominant to I^-; I^+ acts in trans

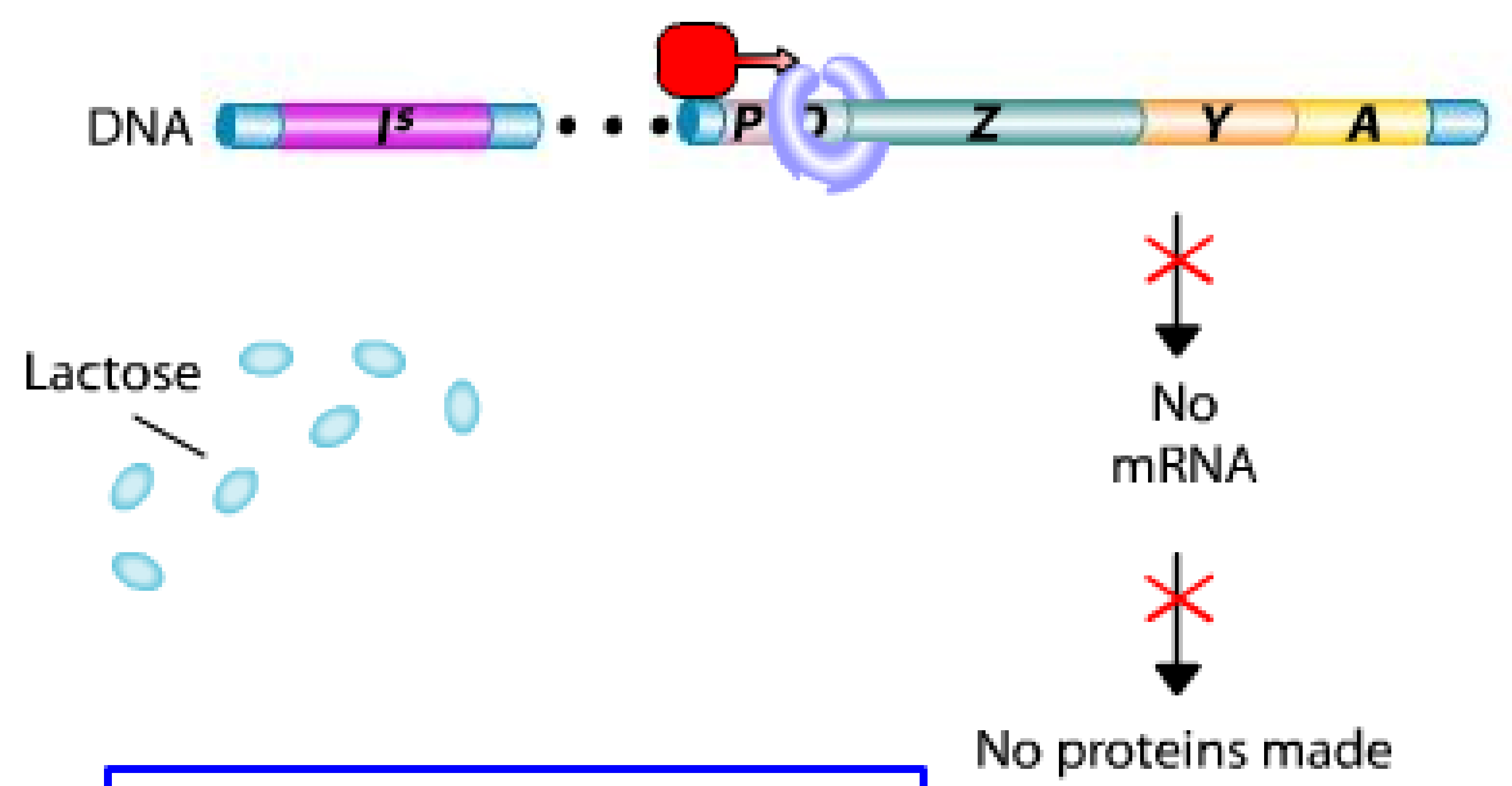
Lac I Mutant : Mutation I^S

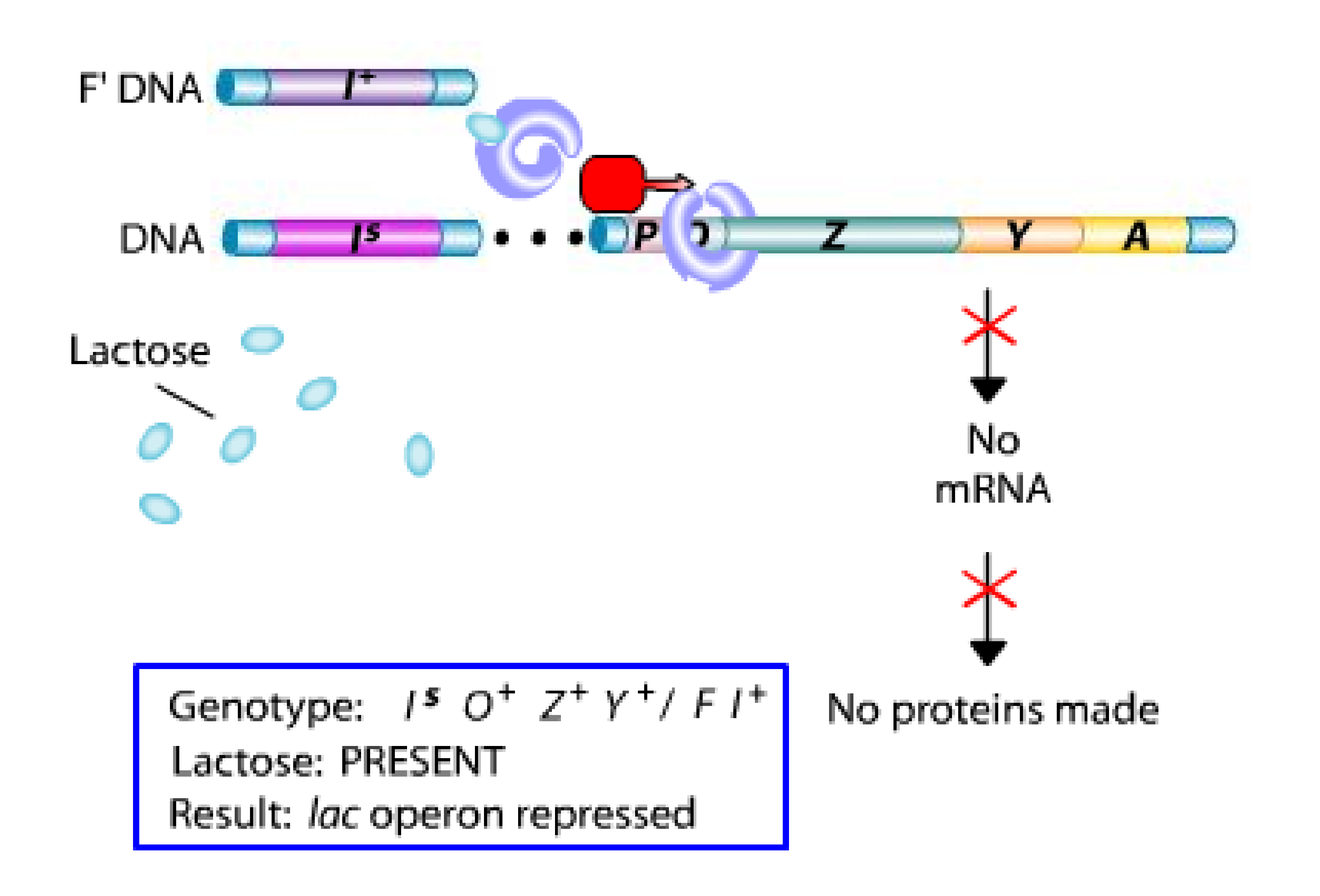


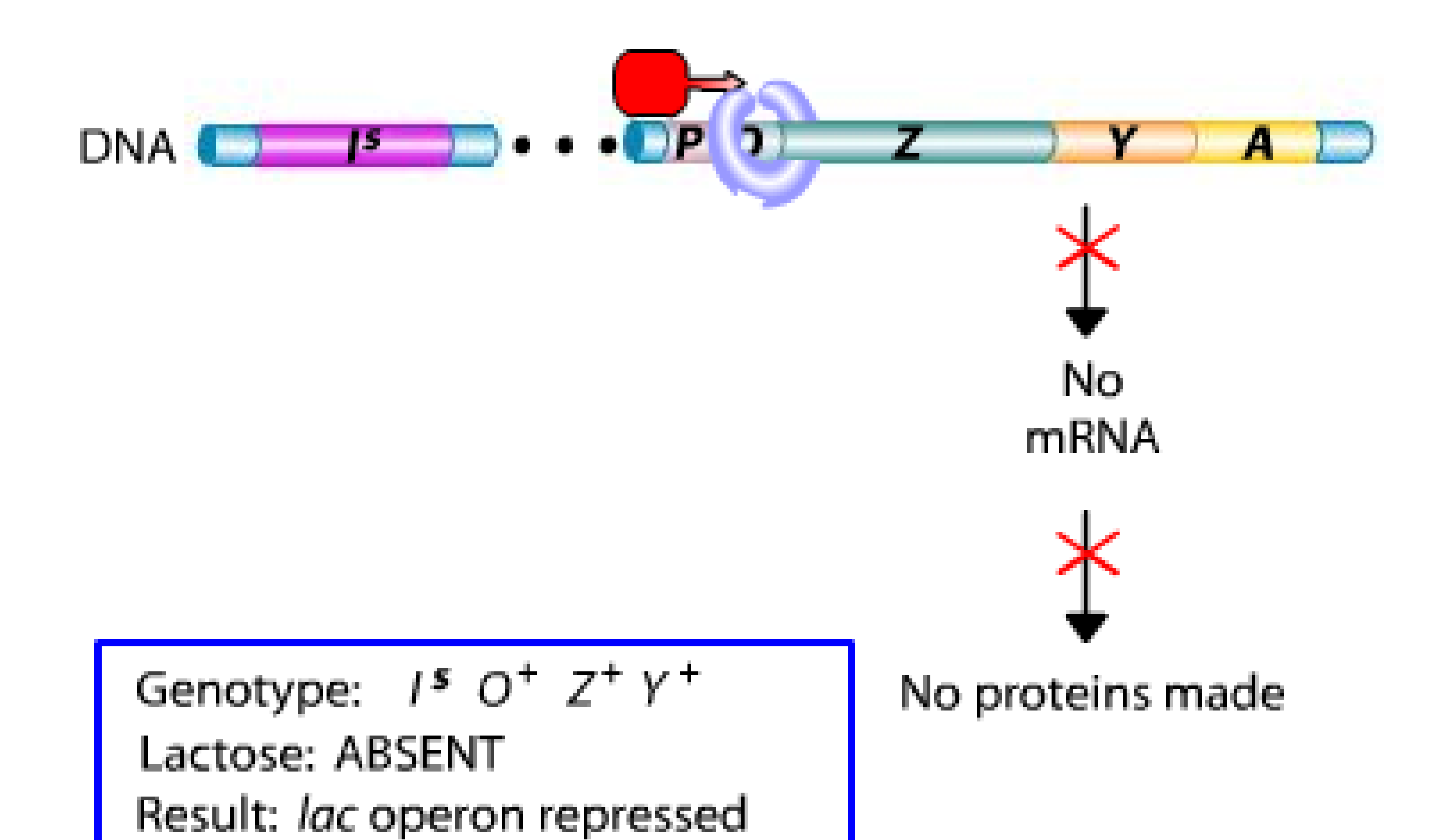
Genotype: I^s O^+ Z^+ Y^+

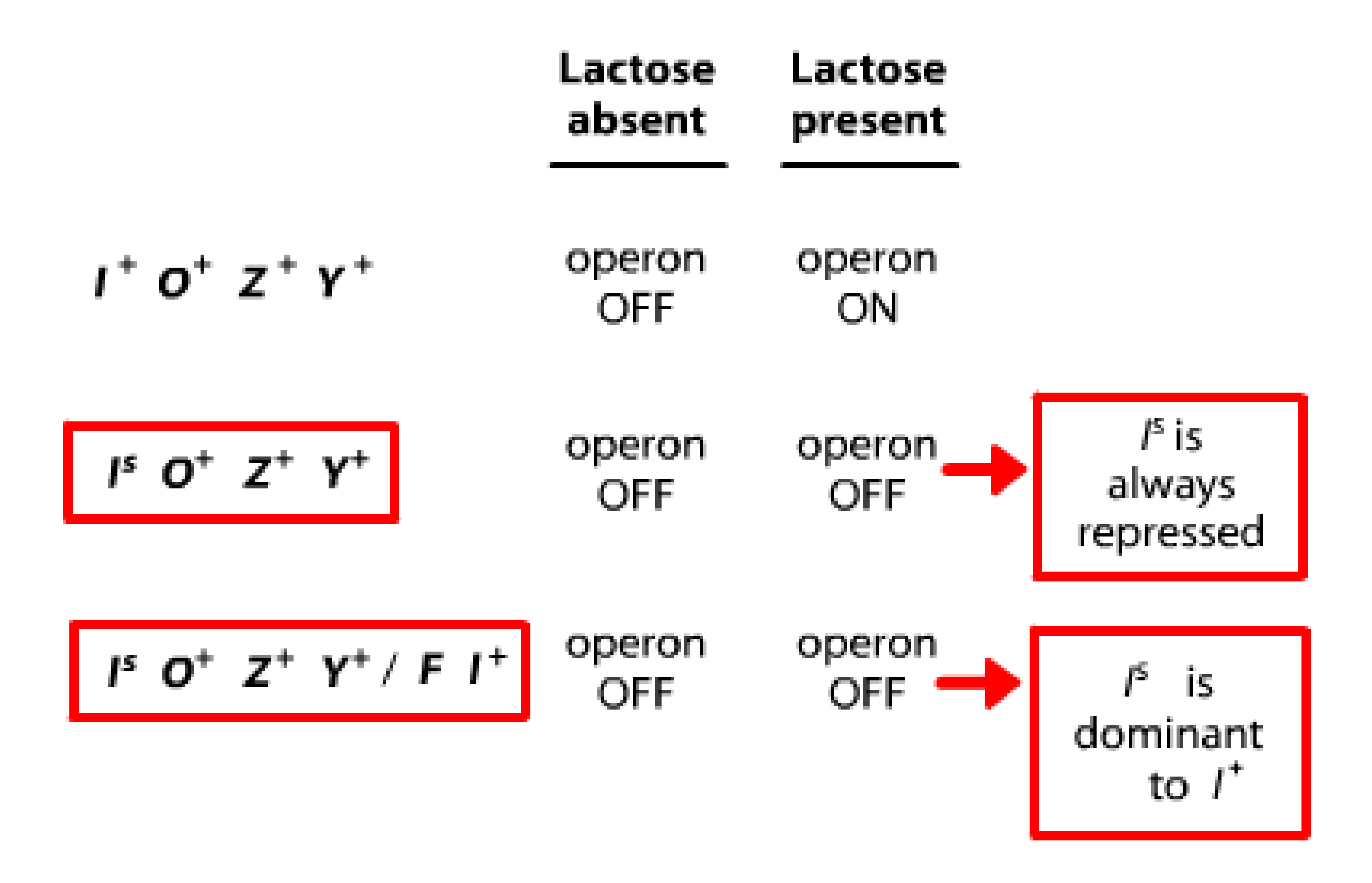
DNA I^S • • • P O Z Y A

Genotype: I^S O^+ Z^+ Y^+


DNA
I^s
P
O
Z
Y
A
Lactose
No
mRNA
No proteins made
Genotype: I^s O^+ Z^+ Y^+
Lactose: PRESENT
Result: lac operon repressed


F' DNA
I^+
DNA
I^s
P
O
Z
Y
A
Lactose
No mRNA
No proteins made
Genotype: I^s O^+ Z^+ Y^+/ F I^+
Lactose: PRESENT
Result: *lac* operon repressed


DNA
I^s
P
O
Z
Y
A
No
mRNA
No proteins made
Genotype: I^s O^+ Z^+ Y^+
Lactose: ABSENT
Result: lac operon repressed


Lactose absent
Lactose present
I+ O+ Z+ Y+
operon OFF
operon ON
Is O+ Z+ Y+
operon OFF
operon OFF
Is is always repressed
Is O+ Z+ Y+ / F I+
operon OFF
operon OFF
Is is dominant to I+

RECAPITULATIF

mutations O^c

Les mutations de l'opérateur sont **constitutives, car le promoteur est incapable de fixer la protéine répresseur;**

Ceci permet à l'ARN polymérase d'avoir libre accès au promoteur.

Les mutations O^c agissent en *cis*, *car elles ne touchent que les gènes structuraux qui leur sont contigus.*

mutations du type lac I

Les mutations qui inactivent le gène *lac I entraînent:*

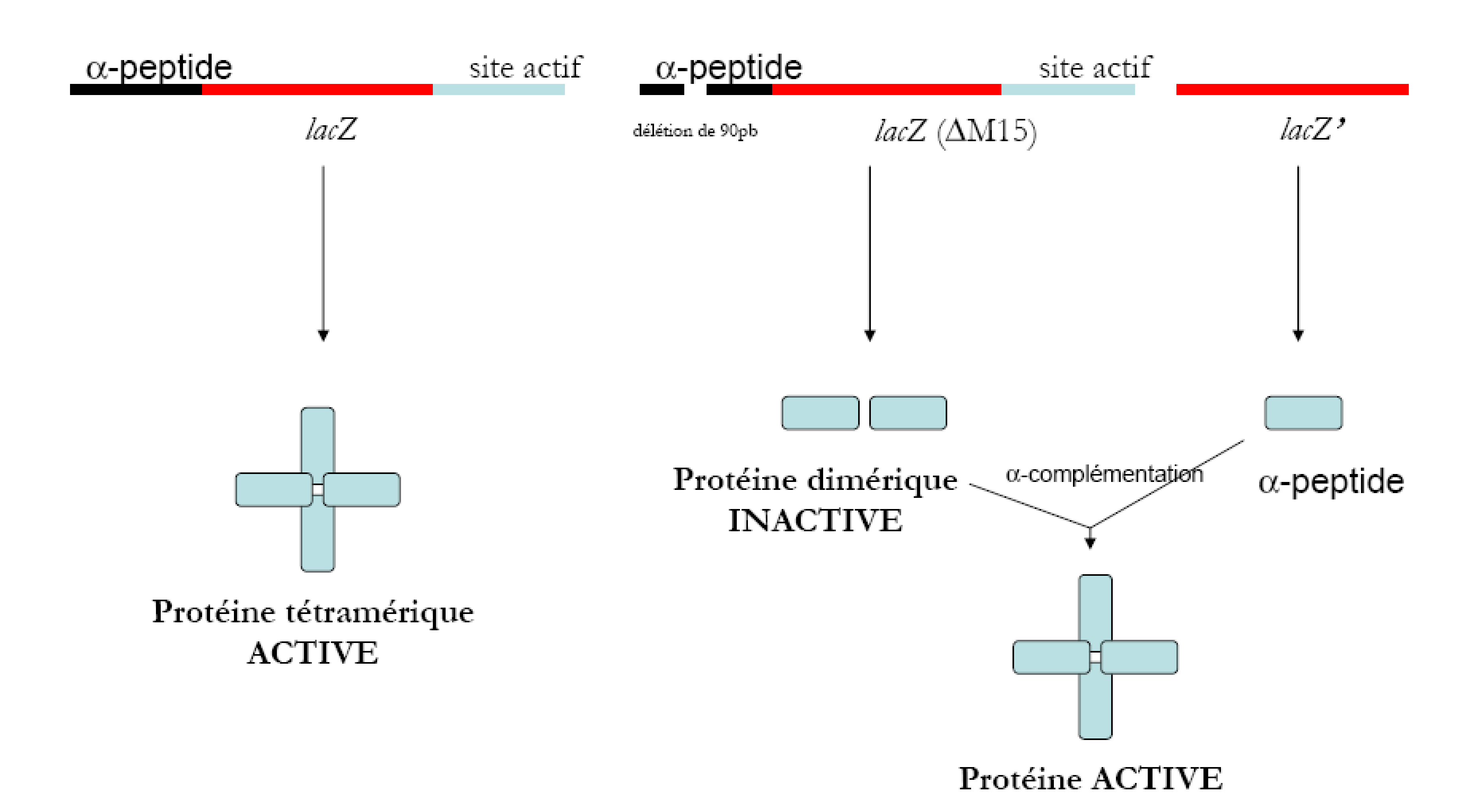
OU BIEN *l'expression* ***constitutive de l'opéron,*** car la protéine du répresseur mutant ne peut plus se fixer sur l'opérateur.

OU BIEN la **répression de l'opéron** car la protéine du répresseur mutant ne peut plus être désactivée par le lactose.

α-complémentation

Utilisation de souches bactériennes mutantes dans le gène *lac Z* :

- synthétisent une β-galactosidase incomplète (dépourvue d'une séquence appelée peptide α) et inactive.
- La séquence codant le peptide α peut être apportée en *trans par un plasmide ;*
- seul, le peptide α n'a aucune activité enzymatique, mais associé avec la protéine codée par *lac Z' il restaure l'activité β-galactosidase de la protéine mutante.*


α-peptide
site actif
lacZ
Protéine tétramérique
ACTIVE
α-peptide
site actif
délétion de 90pb
lacZ (ΔM15)
lacZ'
Protéine dimérique
INACTIVE
α-complémentation
α-peptide
Protéine ACTIVE

l'activité de la β-galactosidase en utilisant le X-Gal

X-Gal

H_2O

β-Galactosidase

Dimérisation et oxydation spontannée

5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo

f1 (+) ori

ampicillin

lacZ'

Sac I

MCS

Kpn I

P lac

pUC ori

pBluescript II KS+

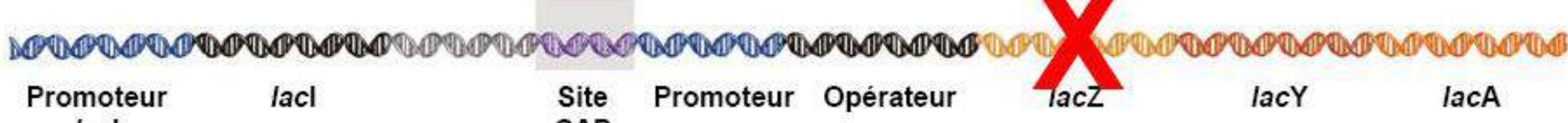
3.0 kb

X-Gal

Donne un composé **BLEU**

Isopropyl Thiogalactoside (IPTG)

Se lie sur le répresseur (lacI) et induit la transcription (*inducteur*)



Utilité de l'opéron lactose pour le clonage



Exercice:

I- On possède deux souches de bactéries, *E. coli* A et B. Les deux souches sont mises à pousser sur milieu de culture en présence ou en absence de lactose et leur capacité à synthétiser la β-galactosidase et la perméase est étudiée (voir tableau 1)

Tableau1.

Souche	Absence de lactose		Présence de lactose	
	β-gal	perm	β-gal	perm
A	-	+	-	+
B	+	-	+	-
C	+	-	+	+
D	+	-	+	+

L'ADN chromosomique de la souche A est soumis à une action enzymatique. La région du système lac est isolée puis clonée au site EcoRI du plasmide pBR322 (figure 1).

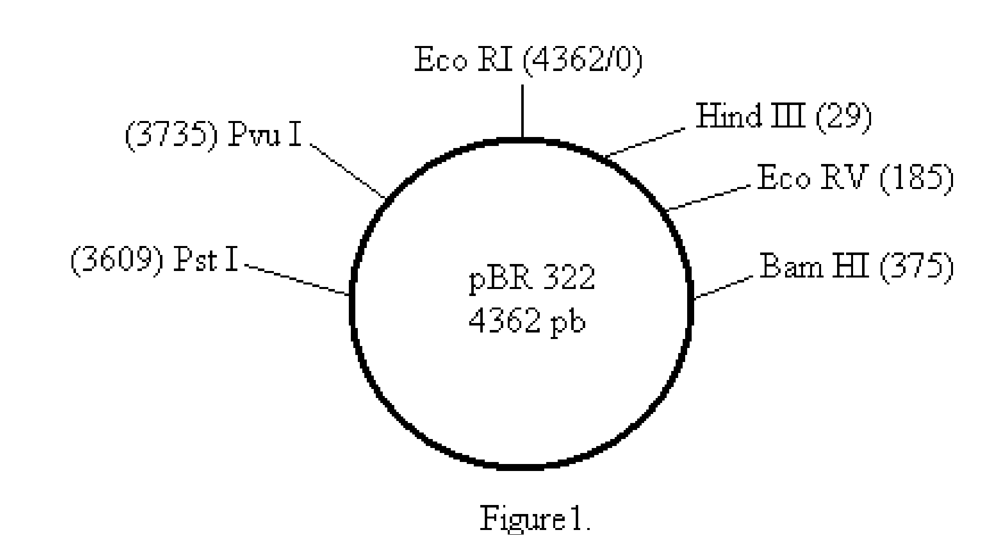


Figure1.

Le plasmide recombinant est ensuite utilisé pour transformer les bactéries de la souche B. La souche issue de cette transformation est appelée C. Sa capacité à métaboliser le lactose est étudiée dans les mêmes conditions que les souches A et B, voir tableau 1.

Questions :

1- Quelle (s) différence (s) génétiques fondamentale (s) existe (ent) entre la souche C et les souches A et B ?

2- Quel est le mode de synthèse de chacune des enzymes chez les souches A, B et C ?

3- Déduire le génotype des souches A, B et C. Justifier votre réponse.

II- L'ADN plasmidique de la souche C est extrait puis soumis à l'action de l'endonucléase de restriction Pst I. Le fragment plasmidique issu de cette digestion est isolé puis refermé sur lui-même et utilisé pour transformer les bactéries de la souche B. La souche issue de cette transformation est appelée D. Sa capacité à métaboliser le lactose est utilisée comme auparavant, (tableau 1). D'autre part, la capacité des quatre souches à résister aux antibiotiques est étudiée (tableau 2).

Tableau 2.

Souche	Milieu contenant la Tétracycline	Milieu contenant l'Ampicilline	Milieu contenant Tétra+Amp
A	-	-	-
B	-	-	-
C	+	+	+
D	+	-	-

+ : présence de colonies ; - : absence de colonies.

Questions :

4- Quelle (s) hypothèse (s) probable (s) proposez-vous pour interpréter les résultats des tableaux 1 et 2 obtenus avec les souches C et D ?

5- Donner le génotype de la souche D.

6- Donner la cartographie de restriction des plasmides contenus dans les souches C et D.

III- Les quatre souches A, B, C et D sont ensuite transférées sur un milieu (a) contenant du glucose, et sur un milieu (b) contenant du lactose et un excès de phosphodiestérase.

Questions :

7- Résumer les résultats obtenus sous forme d'un tableau en ce qui concerne la synthèse de la β-galactosidase et de la perméase sur les milieux (a) et (b).

8- Proposer un modèle moléculaire pour expliquer à l'aide d'un schéma le fonctionnement de l'opéron lactose.

L'opéron Tryptophane* (chez *E. coli*) un exemple d'opéron anabolique répressible

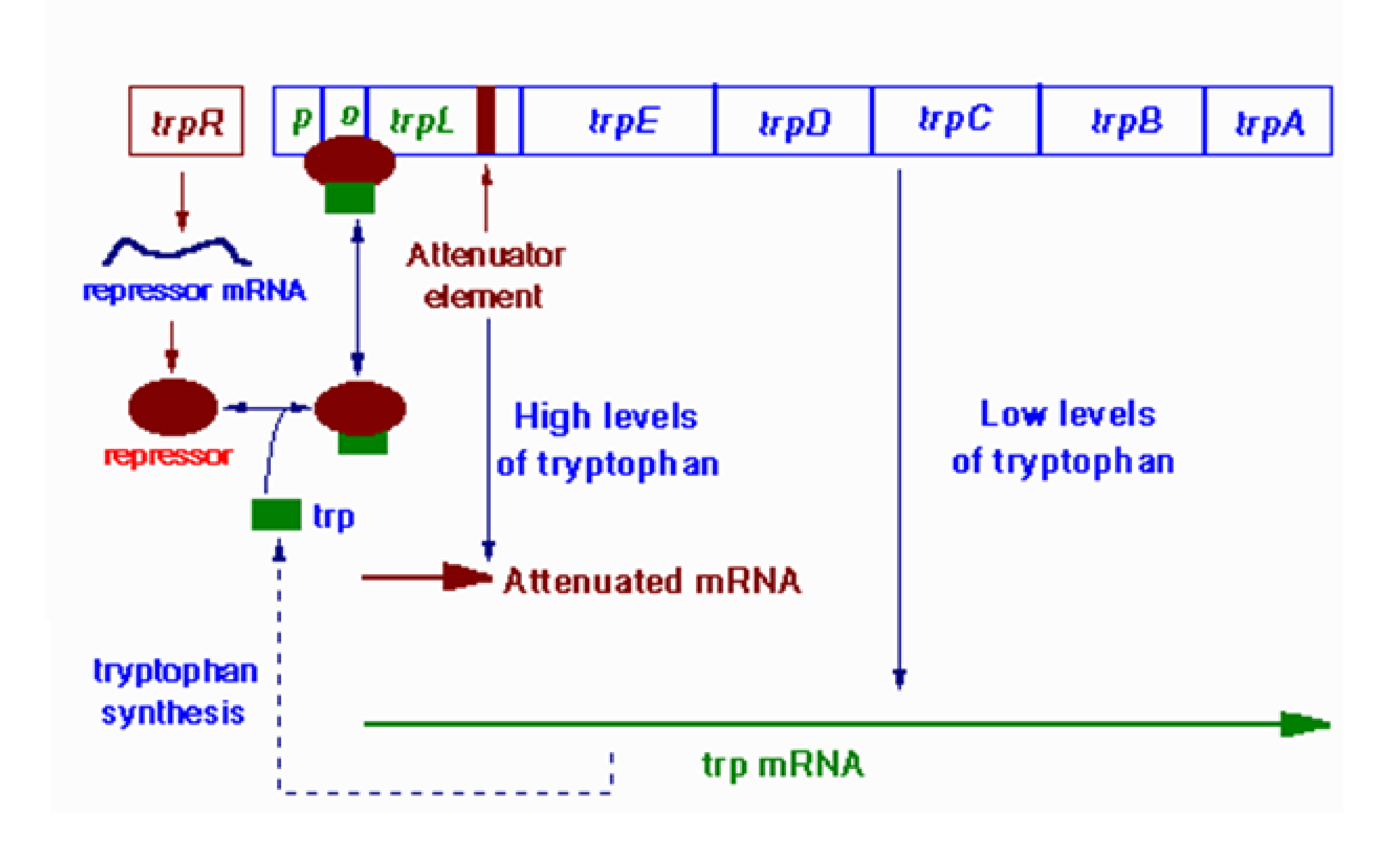
*Tryptophane : acide aminé

4.1. OPERON trp: Définition et structure

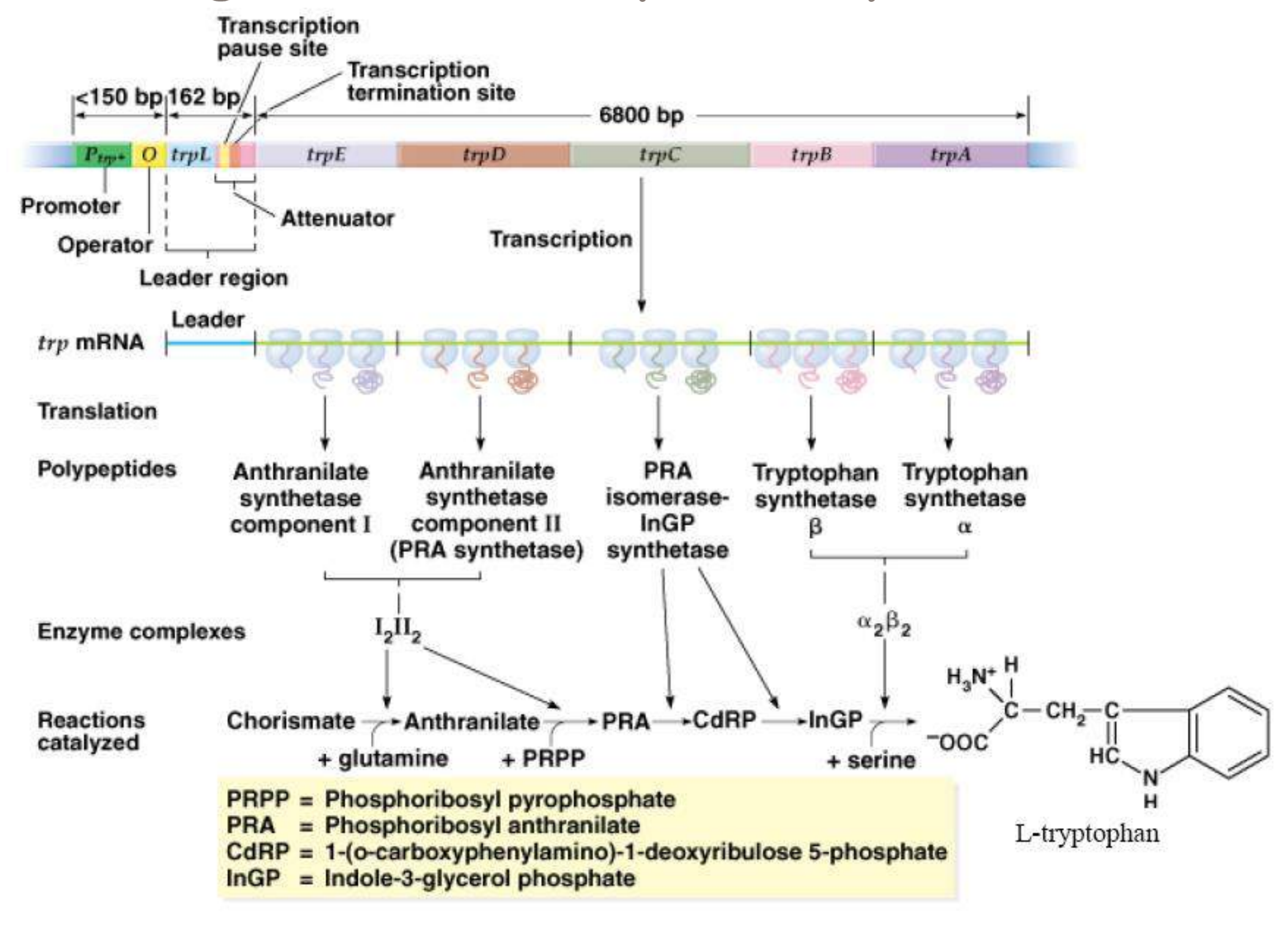
L'opéron trp P O trpE trpD trpC trpB trpA

- *L'opéron trp code pour les enzymes requises pour la synthèse du tryptophane (trpAE)*
- **La synthèse de l'ARNm de l'opéron est contrôlée par un *répresseur* qui *bloque la* transcription lorsqu'il est lié par le tryptophane (*co-répresseur*)**

trp E *trp D*	Anthranilate synthase Phosphoribosyl anthranilae transférase
trp C	Phosphoribosyl isomérase/indoleglycérol phosphate synthase
trp B *trp A*	Tryptophan synthétase α Tryptophan synthase β

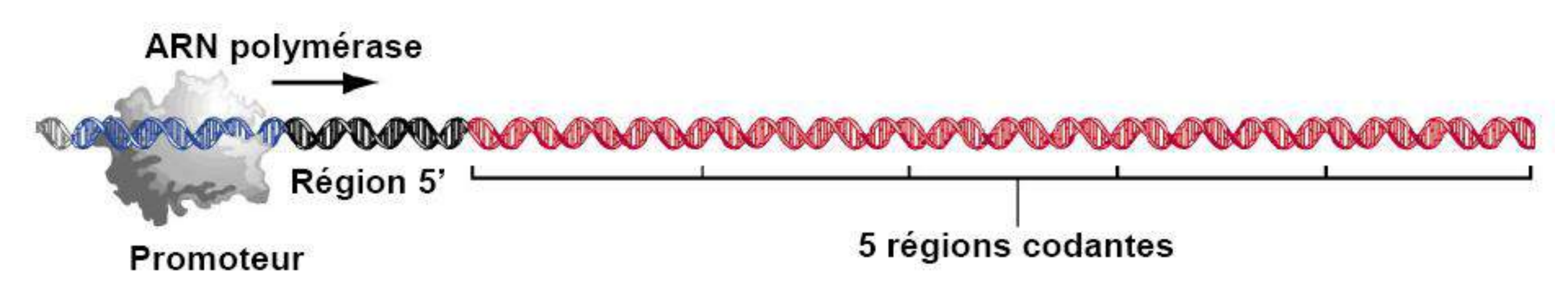

Structure of the trp Operon
trpR
p
o
trpL
trpE
trpD
trpC
trpB
trpA
repressor mRNA
Attenuator
element
repressor
trp
High levels
of tryptophan
Low levels
of tryptophan
Attenuated mRNA
tryptophan
synthesis
trp mRNA

Organisation de l'opéron *Trp* d'*E. coli*

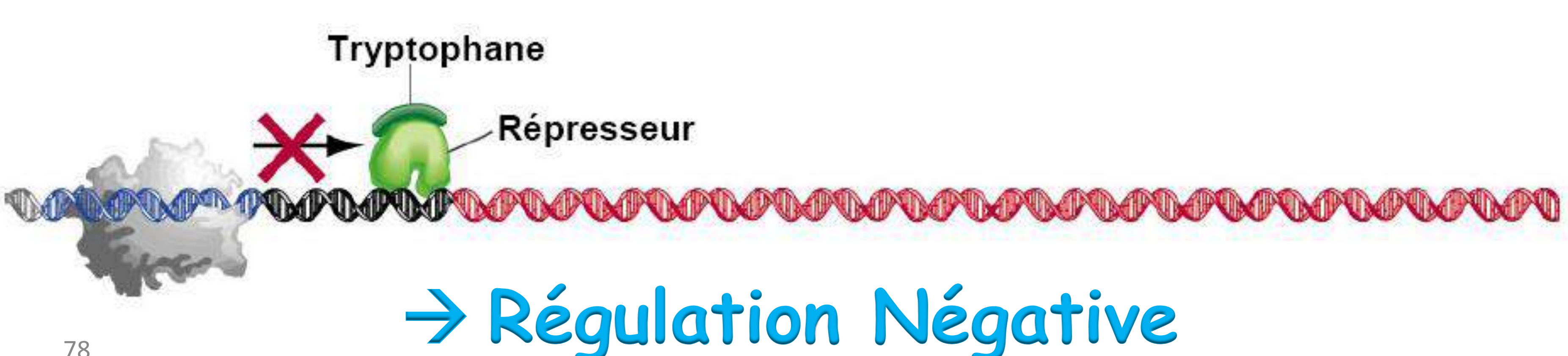


4.2. OPERON trp: fonctionnement

Lorsque le tryptophane est absent, la transcription se produit



Lorsque le tryptophane est présent, la transcription est bloquée.



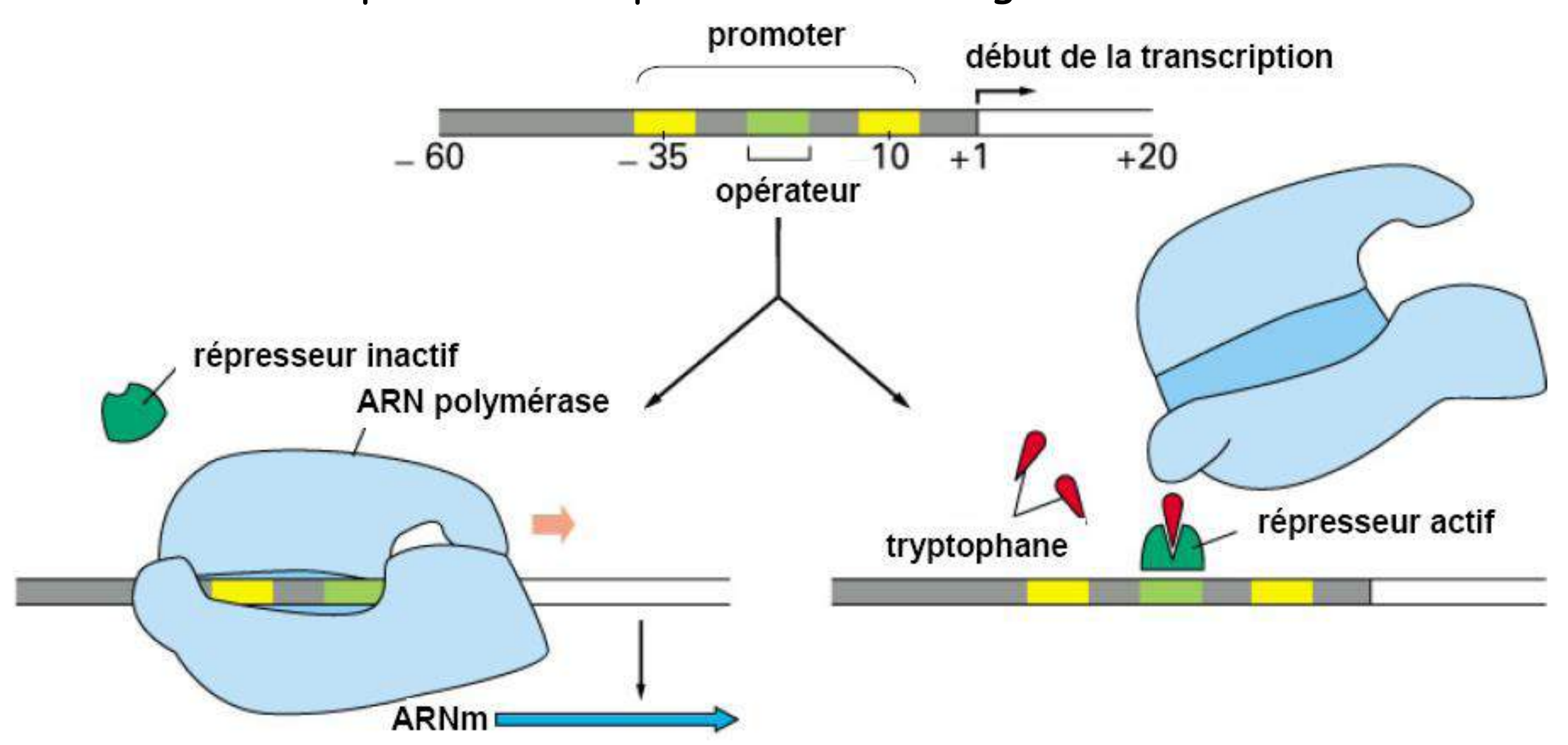
→ Régulation Négative

Régulation de l'opéron tryptophane chez *E. coli*

Mécanisme n°1 Interaction répresseur-opérateur

La fixation du tryptophane au répresseur trp altère sa structure

Un déplacement de 0,8nm des hélices impliquées dans la reconnaissance permet au répresseur d'interagir avec l'ADN.



<u>Cependant</u>, en l'absence du répresseur, la synthèse de l'ARNm de l'opéron trp est encore **partiellement réprimée** par la présence de tryptophane

Expression de l'opéron trp dans des souches *trp*R$^+$ et *trp*R$^-$

	Avec Tryptophane (%)	Sans Tryptophane (%)
trpR$^+$	8	100
trpR$^-$	33	100

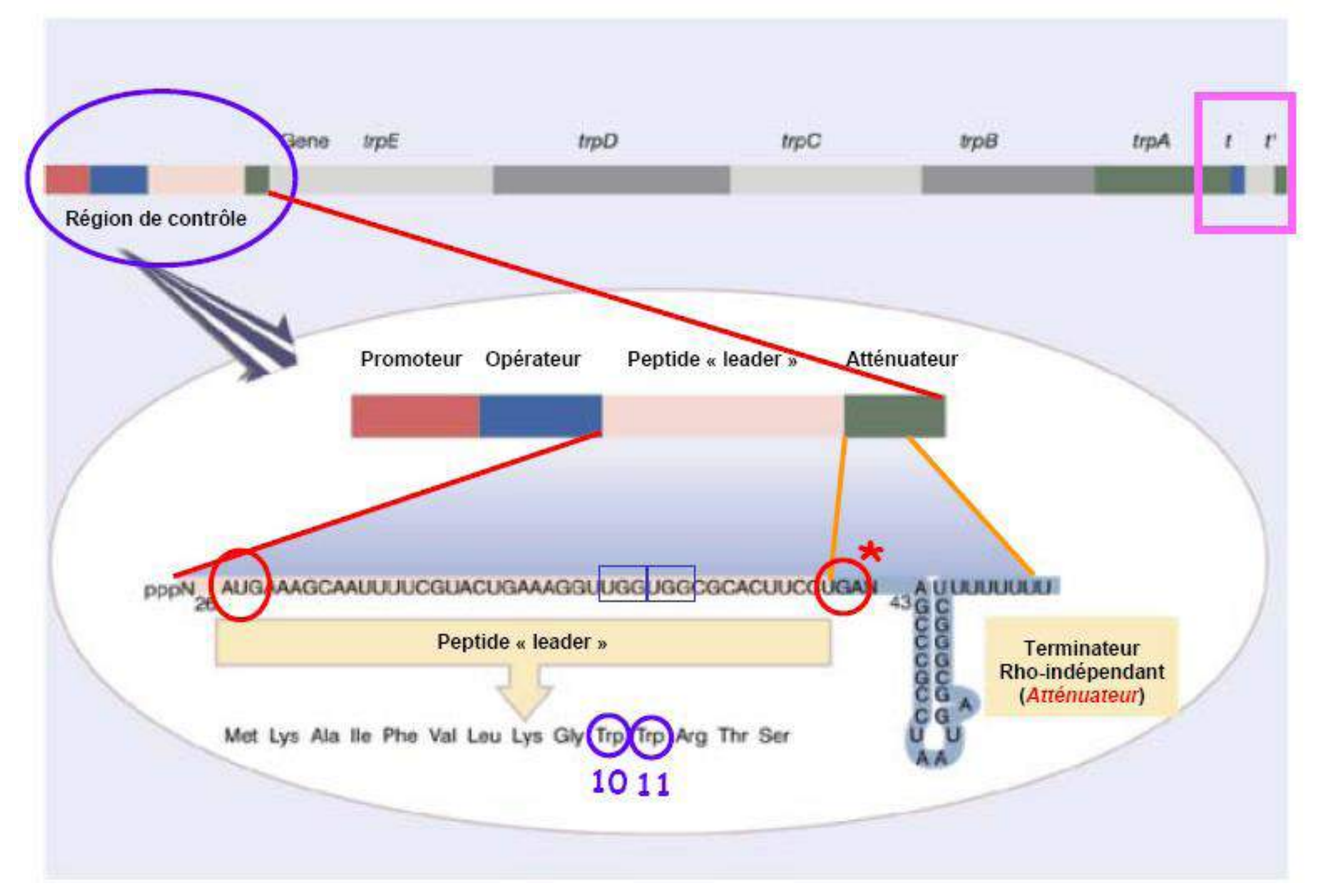
Mécanisme n°2 Terminaison de la transcription

- La transcription est également contrôlée par atténuation, processus qui aboutit à la traduction d'un petit polypeptide.

- Quand les cellules sont privées de tryptophane, les gènes de l'opéron sont exprimés au taux le plus fort;

- Quand la privation en tryptophane est moins sévère, les gènes de l'opéron s'expriment à un niveau plus faible que le maximum.

- L'atténuation régule le niveau de transcription par un facteur de 8 à 10 et combiné avec le mécanisme 1 (interaction répresseur-opérateur) il y a diminution de la transcription d'un facteur 560 à 700.



- Une petite séquence codante en avant de l'opéron trp contient deux codons pour le tryptophane de suite
- Lorsque la quantité de tryptophane dans la cellule est limitée, le ribosome *arrête à ces codons trp*
- La capacité du ribosome de lire ces codons régule un choix de tige et boucle (*terminateur* ou *anti-terminateur*)

Organisation de la région leader/atténuateur de l'opéron *trp*

Pause

Transcription termination

1 2 3 4

AUG UGGUGG UGA AUG

Start codon

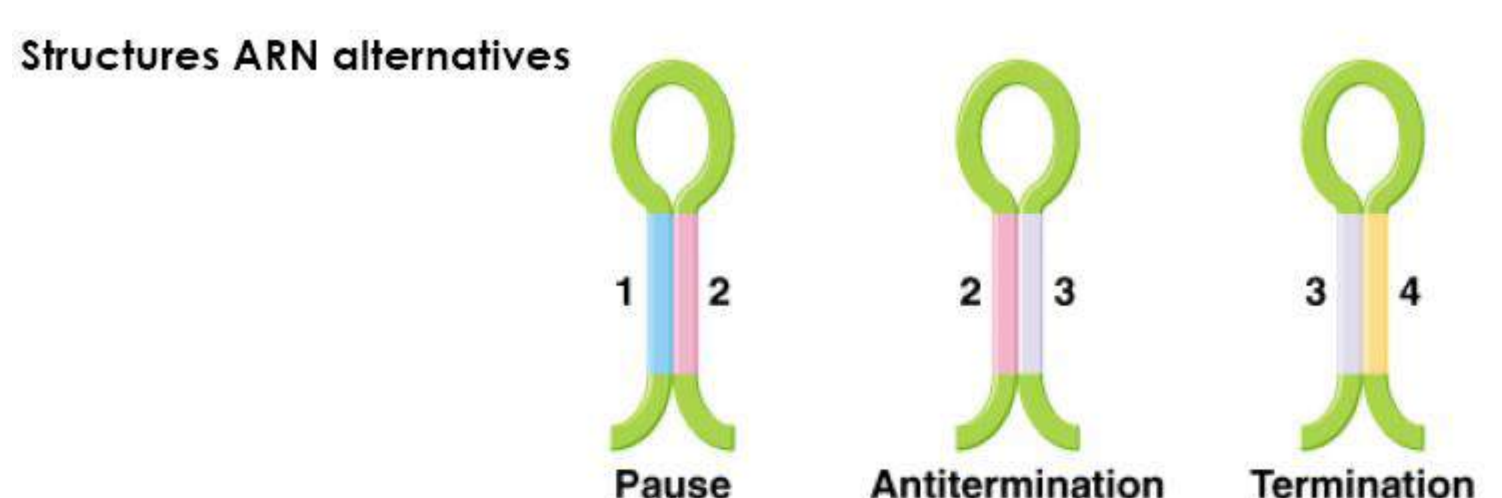
Trp codons

Stop codon

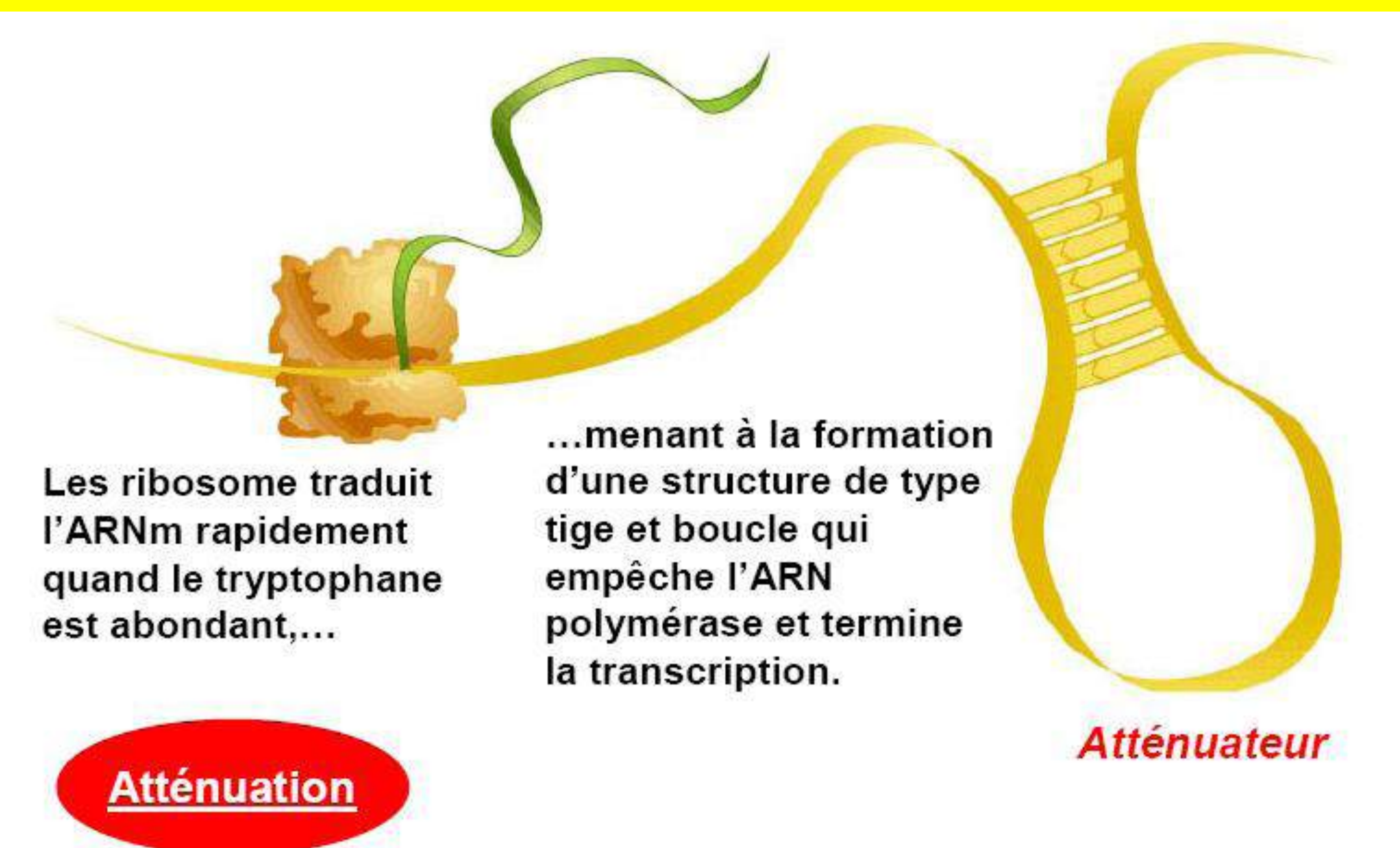
Transcription antitermination

Start codon for *trp* mRNA

Leader peptide coding region

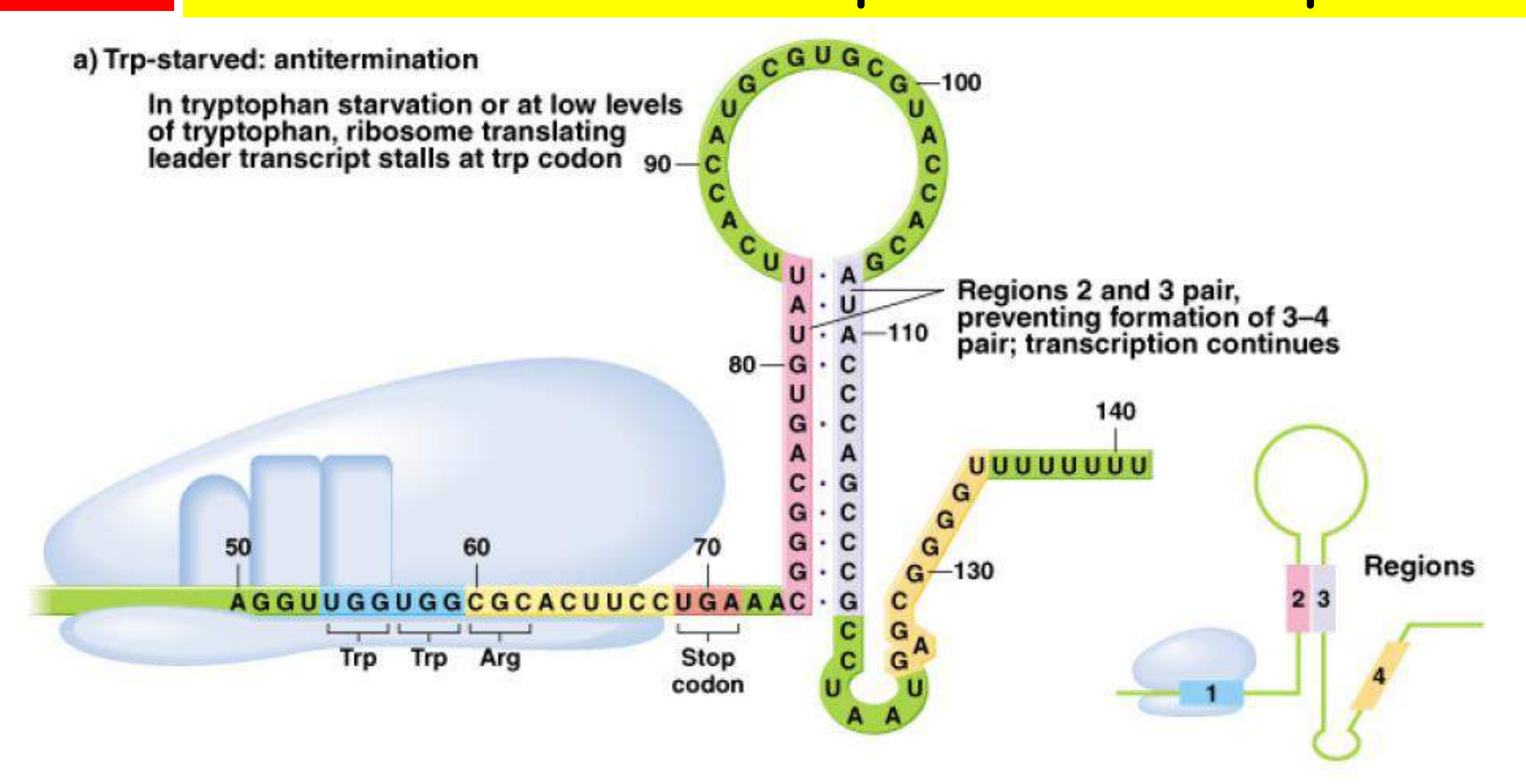


La position du ribosome joue un rôle important dans le phénomène d'atténuation



Atténuation: mécanisme qui contrôle la capacité de l'ARN polymérase de lire un *atténuateur*, *qui est un* *terminateur* *placé au début de la* transcription

Situation 1 : Phénomène d'atténuation pour des cellules privées de trp



<u>le tryptophane est absent (ou en quantité insuffisante)</u>:

1- les trp-ARNt sont indisponibles, le ribosome s'arrête aux codons trp ce qui couvre la région 1.

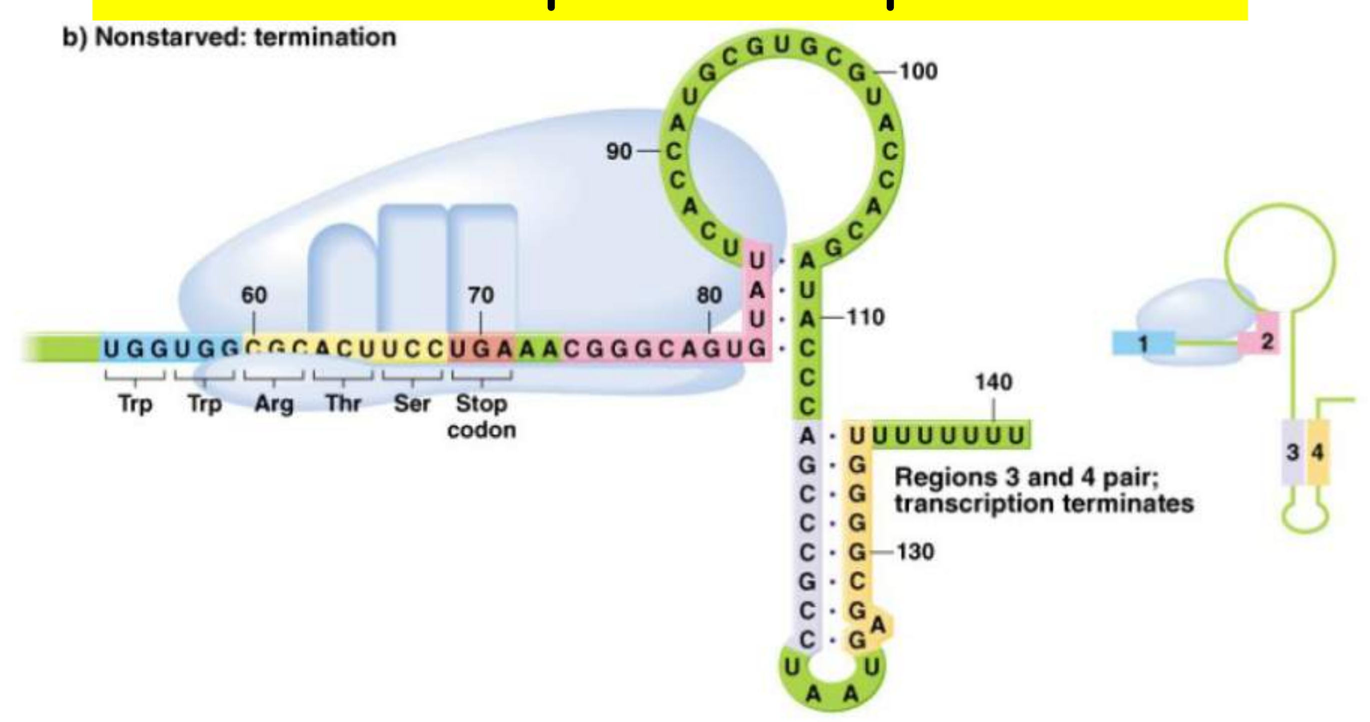
2- la région 1 ne peut s'apparier avec la région 2, à la place la région 2 s'apparie à la région 3.

3- la région 3 ne peut donc s'apparier à la région 4.

4- l'ARN polymérase continue à transcrire l'ensemble de la séquence codante ce qui permet la synthèse complète de l'ARNm.

Situation 2:

Phénomène d'atténuation pour des cellules non-privées de trp



<u>le tryptophane est abondant</u>:

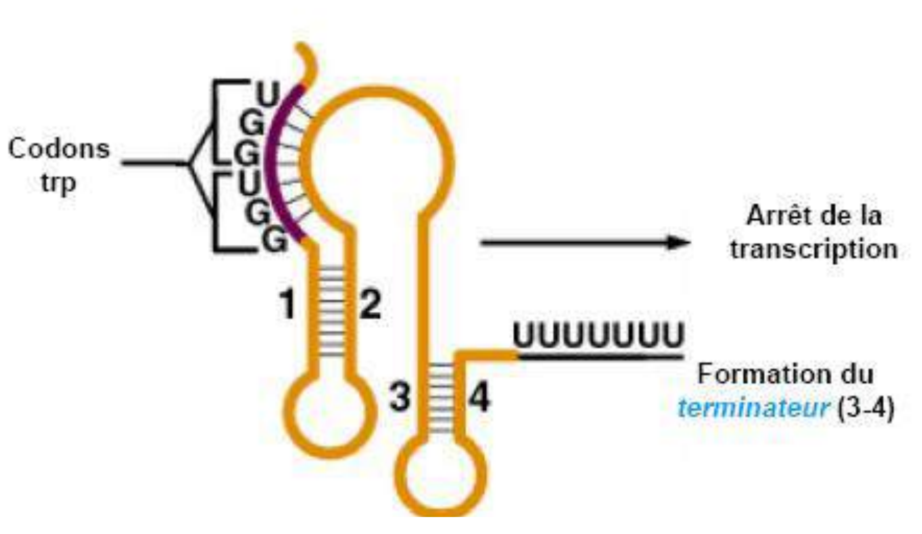
1- le ribosome ne s'arrête pas au niveau des codons trp; il continue à traduire la séquence leader, s'arrêtant au niveau de la région 2

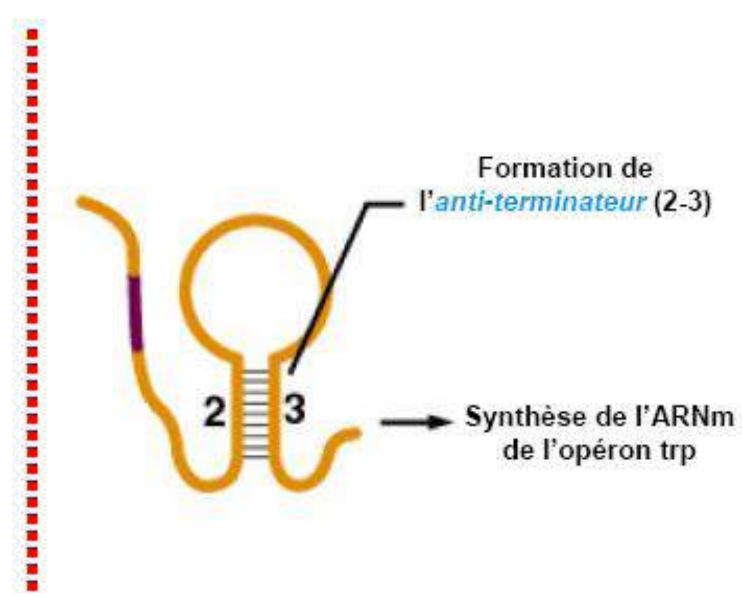
2- la région 2 ne peut s'apparier avec la région 3; cette dernière s'apparie alors avec la région 4.

3- cet appariement 3-4 constitue la séquence « atténuateur » et fonctionne comme signal de terminaison

4- la transcription s'achève avant que l'ARN polymérase atteigne les gènes permettant la synthèse du tryptophane

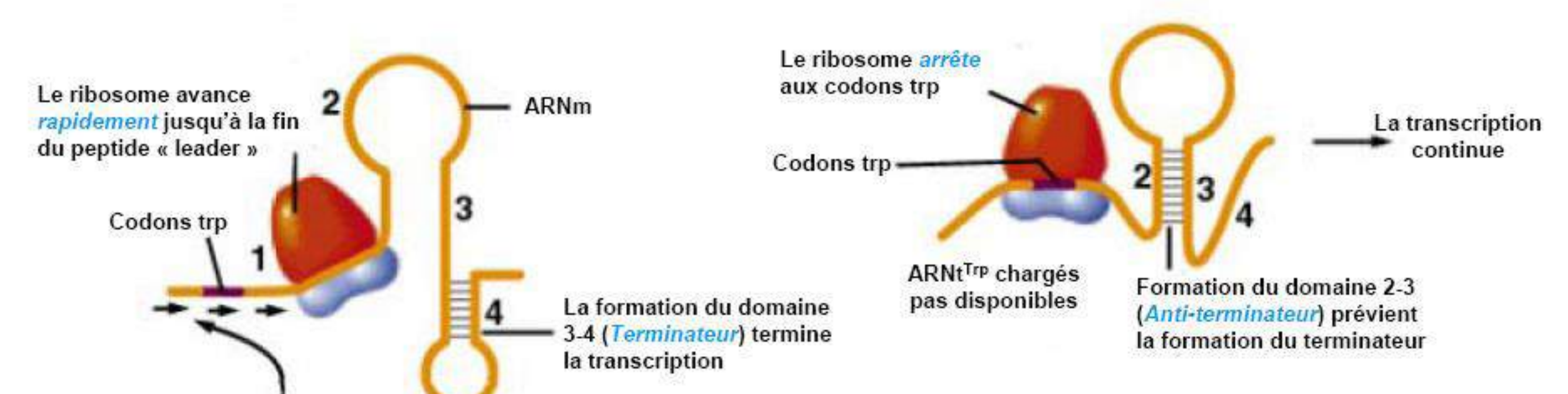
RECAPITULATIF





En présence de Tryptophane

En absence de Tryptophane



Exercice:

Quelles seraient les conséquences d'une mutation non sens au niveau du messager qui code pour le peptide leader ?

S6: Polycopiés cours/TD Génétique